

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Studijní program: Biologie
Studijní obor: Anatomie a fyziologie rostlin
Studijní zaměření: Buněčná a molekulární biologie rostlin



Bc. Jan Konečný

**CUKERNÝ METABOLISMUS ROSTLIN
A ARBUSKULÁRNÍ MYKORHIZNÍ SYMBIÓZA**

**PLANT SUGAR METABOLISM AND
ARBUSCULAR MYCORRHIZAL SYMBIOSIS**

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Jan Jansa, Ph.D.

Praha, 2017

Tímto prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracoval samostatně a uvedl jsem všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její část nebyla použita k získání jiného nebo obdobného akademického titulu.

Poděkování

Rád bych poděkoval mému školitelovi Honzovi Jansovi za trpělivost, vytváření kvalitního pracovního prostředí a odborné rady a vedení. Poděkování také patří celé laboratoři biologie hub, a to zejména Hance Hršelové za metodické rady a pomoc, Hance Gryndlerové za zalévání rostlin a Petře Bukovské a Martině Hujšlové za vedlejší činnosti, které byly ku prospěchu i mé práci. Dále chci poděkovat mé mamě Osaro Konečné za rodinnou náruč a za sazbu a zlom do tisku. Na závěr děkuji knihařství KODEX za tisk a expresní vazbu.

Abstrakt

Studium arbuskulární mykorhizní symbiózy (AMS) – mutualistického vztahu mezi většinou suchozemských rostlin a evolučně starou skupinou hub z oddělení Glomeromycota – je v poslední době prestižní záležitostí. Její rozšířenost a rozsah fyziologického působení AMS na rostliny je zajímavou pro rostlinnou biologii samotnou, ale její důležitost narůstá v době změny klimatu, časté degradace půd a snižujícím se zásobám minerálních hnojiv. Přestože toky některých minerálních látek v AMS, zejména fosforu, byly osvětleny, výměna uhlíku mezi symbionty je stále velkou neznámou. V této experimentální práci jsem využil rozmachu molekulárních a bioinformatických metod při pátrání v doposud zcela neobjasněných tocích uhlíku. Použitými organismy jsou tolerance *Medicago truncatula*, modelová rostlina pro studium symbiotických vztahů, biotických i abiotických stresů, *Rhizophagus irregularis*, široce využívaná arbuskulárně mykorhizní houba pro experimentální studia AMS, a *Sinorhizobium meliloti*, hlízkovitá bakterie fixující vzdušný dusík kompatibilní s *M. truncatula*. Dvě varianty – mykorhizní (M+) a nemykorhizní (NM) tolerance byly analyzovány na několika úrovních. Provedl jsem kontrolu variant, měření obsahu makroprvků fosforu a dusíku a také značení stabilním izotopem uhlíku ^{13}C a sledování jeho toku v experimentálním systému. Stěžejním bodem této diplomové práce je transkriptomická analýza. Pro analýzu celého transkriptomu jsem využil komerčních microarray čipů. Porovnáním M+ a NM variant v softwaru Genevestigator jsem vybral deset kandidátních genů, jejichž exprese byla dále prozkoumána zapomocí kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR nebo qRT-PCR) i v dalších časových bodech růstu tolerance. Změny v expresi těchto genů diskutuji v rámci již publikovaných dat jiných vědeckých týmů a nabízím různé pohledy na zpracované výsledky.

Abstract

The study of arbuscular mycorrhizal symbiosis (AMS) – the mutualist relationship between the most of land plants and evolutionary old fungal group Glomeromycota – is becoming a prestigious topic. The prevalence of and extent of physiological action of AMS on plants is very interesting for the plant biology itself, but its importance grows, notably in time of global climate change, frequent soil degradation and ascending exhaustion of mineral fertilizer reserves. Although the fl in AMS of some minerals, like of phosphorus was enlightened, carbon exchange between the symbionts is still poorly understood. In this experimental work, I utilized the boom of molecular and bioinformatic methods in the quest for completely unexplained carbon fl. The organisms used include barrel medic (*Medicago truncatula*), the model legume for symbiotic relationships, biotic, and abiotic stresses; *Rhizophagus irregularis*, the widely used fungus for such experimental studies of AMS; and *Sinorhizobium meliloti*, the nodulating nitrogen-fixing bacterium compatible with the barrel medic. Two variants – mycorrhizal (M+) and non-mycorrhizal (NM) plants were subjected to several levels of analysis. I have checked the variants, did the measurements of phosphorus and nitrogen contents, as well as I probed the plants with stable carbon isotope ^{13}C and tracked its fl in the experimental system. The main focus of this thesis is transcriptome analysis. I used commercially available microarray chips for whole-transcriptome analysis. By comparing the variants in Genevestigator software, I chose ten candidate genes whose expression was further investigated using quantitative real-time PCR (qPCR or qRT-PCR), also in another time points of medic growth. Changes in the expression of these genes I am discussing within the already published results of foreign scientific teams and I offer various views at the processed results.

Obsah

1. Úvod	12
2. Hlavní cíle	14
3. Stav současného poznání	15
3.1. O arbuskulárně mykorhizní symbióze.....	15
3.1.1. Fyziologie a anatomie symbiotického rozhraní	15
3.1.2. Biochemie periarbuskulárního rozhraní a blízkého okolí.....	17
3.1.3. Osud uhlíku (cukrů) v AM houbě	17
3.2. O cukerných přenašečích	18
3.2.1. Major Facilitator Superfamily – MFS.....	18
3.2.1.1. Sacharózové přenašeče – SUT.....	18
3.2.1.2. Monosacharidové přenašeče – MST.....	20
3.2.1.3. Plastidové přenašeče – GPT, PPT, EPT, NTT, XPT	21
3.2.2. Obousměrné přenašeče SWEET	21
3.3. O rostlinném transportu.....	23
3.3.1. Nakládání do floému	23
3.3.2. Vykládání z floému.....	24
3.3.3. Využití asimilátů	25
3.4. Minerální živiny a arbuskulárně mykorhizní symbióza.....	25
3.4.1. Fosfor.....	25
3.4.2. Draslík	26
3.4.3. Sodík.....	26
3.4.4. Dusík	27
4. Materiál a metody.....	28
4.1. Modelové organismy	28
4.1.1. Medicago truncatula.....	28
4.1.2. Sinorhizobium meliloti.....	28
4.1.3. Rhizophagus irregularis	28
4.2. Zakládání pokusu	29
4.3. Sklizně rostlin.....	29
4.4. Laboratorní metody	30

4.4.1. Barvení kořenů Trypanovou modří:	30
4.4.2. Stanovení koncentrace fosforu Malachitovou metodou:	31
4.4.3. Značení rostlin ^{13}C a podzemní respirace:	31
4.4.4. Izolace RNA	31
4.4.5. Ověření koncentrace RNA na nanodropu	32
4.4.6. Ošetření deoxyribonukleázou (DNázou) a příprava pro RT-PCR	32
4.4.7. RT-PCR: Tvorba cDNA reverzní transkripce	32
4.4.8. Ověření kolonizace pomocí qRT-PCR.....	33
4.4.9. Kontrola kvality RNA a analýza na DNA čipu (microarray).....	33
4.4.10. qRT-PCR: Kvantitativní PCR v reálném čase.....	33
4.4.11. 33	
4.5. Metody in silico	33
4.5.1. Design specifických primerů pro vybrané geny.....	33
4.5.2. Analýza genové exprese v prostředí Genevestigator®	34
4.5.3. Anotace vybraných genů	35
5. Výsledky	37
5.1. Suchá hmotnost biomasy M^+ a NM rostlin je srovnatelná.....	37
5.2. M^+ rostliny byly kolonizované, NM nikoliv	37
5.3. Celkový obsah i koncentrace fosforu je v M^+ rostlinách dvojnásobný.....	38
5.4. Celkový obsah i koncentrace dusíku je v M^+ rostlinách vyšší.....	39
5.5. M^+ rostliny nafilovaly více ^{13}C než NM rostliny	39
5.6. M^+ rostliny respirovaly více než NM rostliny.....	41
5.7. Vybrané geny vykazují rozdílnou expresi během vývoje rostliny	41
5.7.1. SWEET1b (ST3), GPT1 (ST5), ST9 a ST10 se zapínají v M^+ kořenech	41
5.7.2. Na^+/urea transporter (ST7) a NDP-sugar transferase (ST8) zvyšují expresi v M^+ kořenech, v prýtu opačně.....	42
5.7.3. Exprese Mtst1 (ST2) a ST6 závisí na ontogenetickém vývoji rostlin	42
5.7.4. TMT (ST4) a TIF2alfa (ref1) jsou v M^+ kořenech potlačeny, v prýtu obdobně kromě prvního bodu.....	42
5.7.5. SWEET3c (ST1) nevykazuje výraznou změnu exprese v kořenech, v prýtu však ano	42
5.7.6. ST10 má mírně zvýšenou expresi v M^+ prýtu	42
5.7.7. Mtst1 (ST2), SWEET1b (ST3), GPT1 (ST5), ST6 a ST9 jsou velmi slabě exprimovány v prýtu	42

5.7.8. TEF1 (ref2) nevykazuje průkazné rozdíly ve své expresi	43
5.8. Neznámý protein ST9 je membránový přenašeč z rodiny MFS ...	43
6. Diskuze.....	65
6.1. Změny v expresi fosfátových transportérů jsou zodpovědné za vyšší koncentraci fosforu v M+ rostlinách	65
6.2. Vyšší zásobení rostlin dusíkem je způsobeno vyšší aktivitou nitrifikačních bakterií.	66
6.3. Přítomnost AM houby je patrná na zvýšené podzemní respiraci a AM houba zvyšuje fotosyntetickou fixaci, nejspíše díky posílení jímající kapacity kořene	66
6.4. Exprese GPT1 je zodpovědná za vyšší metabolickou aktivitu kořenových plastidů	67
6.5. Na ⁺ /urea symportér je zodpovědný za remobilizaci dusíku v mykorhizních kořenech.....	69
6.6. Některé geny exprimované i v NM rostlině reagují na vznik nového sinku	69
6.7. Tři geny mohou být přímo zodpovědné za přenos cukrů na periarbuskulární membráně	71
7. Závěr.....	75
8. Reference.....	75

Seznam zkratek

AAP – aminokyselinová permeáza
ADP – adenosindifosfát
AM – arbuskulárně mykorhizní
AMP – adenosinmonofosfát
AMS – arbuskulárně mykorhizní symbióza
AMT – amoniakový transportér
ATP – adenosintrifosfát
ATPáza – adenosin trifosfatáza
BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
cDNA – komplementární DNA
cAMP – cyklický adenosinmonofosfát
cGMP – cyklický guanosinmonofosfát
CCTOP – program Constrained Consensus TOPology
DEPC – diethylpyrokarbonát
DMAPP – dimethylallylpyrofosfát
DNA – deoxyribonukleová kyselina
DTT – dithiotreitol
DUR – aktivní transportér močoviny
E-4-P – erytróza-4-fosfát
EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
ER – endoplazmatické retikulum
G-6-P – glukóza-6-fosfát
GA-3-P – glyceraldehyd-3-fosfát
GDH – glutamát dehydrogenáza
GOGAT – glutamin 2-oxoglutarát aminotransferáza
GS – glutamin syntetáza
GPT – glukózafosfát translokátor
HMMTOP – program Hidden Markov Model TOPology
M+ – mykorhizní varianta
MEP – 2-C-methyl-D-erythritol 4-fosfát
MEPP – methylerythritolfosfátová dráha
MFS – major facilitator superfamily
mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina
MST – monosacharidový transportér
MtGEA – Medicago truncatula Gene Expression Atlas
NAD – nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NADH – nikotinamidadenindinukleotid (redukována forma)
NADP – nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaná forma)
NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukována forma)
NCBI – National Center for Biotechnology Information
NDP – nukleotiddifosfát
NM – nemykorhizní varianta
NTT – nukleotidový translokátor
OPPP, PPP – (oxidativní) pentózofosfátová dráha
P, Pi – anorganický fosfát

PCR – polymerázová řetězová reakce
PEP – fosfoenolpyruvát
pGlcT – plastidový glukózový transportér
PMT – polyol / monosacharidový transportér
PPT – fosfoenolpyruvát translokátor
PT – fosfátový transportér
qRT-PCR, qPCR, RT-PCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
R-5-P, Ri-5-P – ribóza-5-fosfát
Ref – referenční gen
RNáza – ribonukleáza
ROS – reaktivní forma kyslíku
RPM – otáčky za minutu
RuBisCO – ribulózabifosfátcarboxyláza/oxigenáza
SUT, SUC, SUF – sacharózový transportér
ST – sacharidový transportér
SWEET – sugars will eventually be exported transporter
TEF – translační elongační faktor
TIF – transkripční iniciační faktor
TMT, TST – tonoplastový (mono)sacharidový transportér
TPT – trióza-fosfát translokátor
Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan
XPT – xylulózafosfát translokátor

Zkratky organismů:

Mt, MTR – *Medicago truncatula*
At – *Arabidopsis thaliana*
Bv – *Beta vulgaris*
Cs – *Citrus sinensis*
Ec – *Escherichia coli*
Gint – *Glomus intraradices*
Gmos – *Glomus mossea*
Gp – *Geosyphon pyriformis*
Hs – *Homo sapiens*
Lj – *Lotus japonicus*
Me – *Manihot esculenta*
Nt – *Nicotiana tabacum*
Os – *Oryza sativa*
St – *Solanum tuberosum*
Sl – *Solanum lycopersicum*
Vv – *Vitis vinifera*
Zm – *Zea mays*

Kódy signifikance (p-hodnoty) v grafech:

0 < *** < 0,001 < ** < 0,01 < * < 0,05 < . < 0,1 < ns < 1

1. Úvod

Lidská civilizace dosáhla v posledních desítkách let velkého technologického rozmachu. Jsme schopní komunikovat a cestovat téměř neomezeně po celé planetě během krátkého okamžiku zvednutím telefonu či vzlétnutím letadla, dokonce kolonizujeme tak vzdálené krajiny jako je oběžná dráha naší planety Země. Byly vymáceny některé choroby a proti dalším se úspěšně bojuje, vzrůstá kvalita a délka života. Lidská populace pravděpodobně nikdy nedosahovala takových čísel. Jak ale pravil český spisovatel Karel Čapek: „Civilizace není přece jen nic víc nežli fasáda, která jakž-takž maskuje starou divočinu života,“ a jednou ze základních potřeb člověka je příjem potravy. Rostoucí populace vyžadovala vysokou zemědělskou produkci již v dobách Římské říše a i dnes dobýváme nové krajiny pro ukojení hladových krků. Přirozené ekosystémy, mnohdy ještě nedávno nedotčené člověkem, jsou likvidovány neuvěřitelnou rychlostí a místo nich je tvořen ekosystém umělý, který – jak se nyní ukazuje – není tak efektivní, jak jsme si mysleli. Ne co se týče produkce, ale co se týče udržitelnosti (Tsiafouli a kol., 2015). Jednou z ran do idylky intenzivního zemědělství byly zprávy o možném vyčerpání zásob fosfátových hnojiv. Přestože je fosfor 11. nejhojnějším prvkem na naší planetě, je nejčastější limitující živinou a na rozdíl od dusíku nelze vyrobit fosfátová hnojiva prakticky jinak než těžbou fosfátových ložisek. Fosfátových zásob ale je, zdá se, dostatek a důležitější budou socio-ekonomické a ekologické záležitosti týkající se dostupnosti fosfátových hnojiv (Ulrich a Frossard, 2014). Dalším strašákem nadměrného růstu lidské populace je globální změna klimatu a dramaticky narůstající koncentrace oxidu uhličitého. Různé názorové tábory se nemohou shodnout, zda je za tuto změnu zodpovědný člověk či nikoliv, a pokud ano, tak jak velký podíl na této změně má.

Jakožto vizuálně založená stvoření jsme schopni hledět do vesmírných dálav a charakterizovat uspořádání jiných hvězdných systémů a galaxií, ale naše znalosti planetárních oceánů a půd jsou slabé. Půdy obsahují více organického uhlíku než atmosféra a organismy dohromady, tudíž jejich důležitost pro planetární cyklus uhlíku je nasnadě. Půdní mikrobiální organismy představují základní trofickou úroveň potravního řetězce a jsou zodpovědné za celkovou funkčnost ekosystému (Veresoglou a kol., 2015) – využívají primární organický substrát, částečně jej mineralizují, částečně humifikují, přičemž uvolňují minerální živiny, například těžko dostupný fosfor, nebo je imobilizují jako v případě uhlíku. Manipulace půdní mikrobiální diverzity může mít dramatické důsledky na vícero ekosystémových funkcí jako je rozklad opadu, koloběh živin a sekvestraci uhlíku (Wagg a kol., 2014) a až v poslední době, za pomoci molekulárních metod a především finančně dostupné sekvenace půdních vzorků, objevujeme, jak rozsáhlá může mikrobiální diverzita být, a jaké funkce přináší. Tento půdní život dává vzniknout organické hmotě, která je velmi důležitá, protože zásobuje rostliny živinami, pomáhá snižovat půdní erozi a zvyšuje schopnost půdy zadržovat vodu (Schulten a Schnitzer, 2007). V některých ekosystémech jsou pro ukládání uhlíku do půdy důležité i arbuskulárně mykorhizní (AM) houby. Hyfy AM hub jsou zastoupeny – až z poloviny – v biomase travnatých půd (Olsson a kol., 1999). Dokonce lze nalézt pozitivní korelace mezi půdním uhlíkem a AM houbovými hyfami a tím zvyšující se ukládání uhlíku do půdy (Zhu a Miller, 2003; Rillig, 2004; Leifheit a kol., 2015). Na druhou stranu v některých systémech mohou AM houby půdní uhlík snižovat (Hodge a kol., 2001; Cheng a kol., 2012).

Pro udržení funkce ekosystémů je velmi důležité vyhnout se vymírání druhů podzemních organismů (Veresoglou a kol., 2015). Bude to těžké, neboť morální a estetické argumenty pro zachování bohatosti neviditelných, půdních organismů jsou méně intuitivní. Naštěstí lze využít naší divokosti a zaútočit na bazální lidskou potřebu – hlad. Orné půdy ubývá a tudíž pro nakrmění konstantně rostoucí světové populace je kriticky důležité zvýšit výnosy plodin (Spojené národy, 2015 - <http://www.un.org/sustainabledevelopment/>). Pro budoucí udržitelné zemědělství je zásadní, aby byly další výnosy dosaženy stávajícími i nižšími dávkami hnojiv (FAO, 2009; Xu a kol., 2010;). Jelikož AM symbióza (AMS) nachází praktické uplatnění v zemědělství, zahrad-

nictví, zalesňování a ekosystémového hospodaření (Bethlenfalvay a Schüepp H, 1994; Barea a Jeffries, 1995.), vzniká velký zájem na úspěšné zapojení mykorhizní symbiózy do zemědělství (Gianinazzi a kol., 2010).

Na katedře experimentální biologie rostlin se těchto témat dotýkáme, přesto na trochu jiné úrovni. Zkoumat vliv AM hub na rostliny a ekosystémy lze čistě z ekologické stránky, a také čistě z fyziologické stránky. Kromě vlivu AM hub na funkce ekosystémů totiž není řádně probádané ani fungování této symbiózy *v rostlině na buněčné úrovni*. K prolnutí těchto badatelských zájmů dochází v laboratoři biologie hub sídlící v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd ČR, v.v.i., jehož součástí jsem měl tu čest být. V experimentálních systémech se odstraňuje velké množství různých faktorů účastnících se modelové situace, abychom mohli porovnávat situaci pouze s odlišností jednoho faktoru. Záludnou situací ve výzkumu AMS je dosažení oboustranně prospěšného, tj. mutualistického vztahu. Pozitivní růstové odpovědi bývá dosaženo za normálních světelných podmínek, tj. za dostupnosti rostlinného uhlíku, a za nízké dostupnosti půdních živin, jejichž příjem do rostliny AM houba zlepšuje (Walder a van der Heijden, 2015). V přírodě je totiž v jednom společenství organismů zároveň několik rostlin a několik hub, jak jedinců, tak druhů, a každý může reagovat rozdílně. Proto se soudí, že protichůdné závěry z některých studií mohou být způsobeny rozdílnou kombinací pěstované rostliny a houby, použitým substrátem nebo hnojivem (Boldt a kol., 2011). Všechny možné kombinace však při AMS sdílejí shodný znak – biotrofní AM houba je živena sacharidy od symbiotické rostliny, která je vyrábí fotosyntetickou asimilací atmosférického CO₂. Jak je tato cesta uskutečňována na molekulární úrovni? Jakým způsobem je houba krmena rostlinou? Tyto otázky týkající se světově důležitého symbiotického vztahu jsou v současnosti poodkrývány kruček po kručku – včetně této diplomové práce.

2. Hlavní cíle

- Vypěstovat mykorhizní rostliny za srovnatelných experimentálních podmínek s rozdílem úspěšné kolonizace arbuskulárně mykorhizní houbou
- Provéřít změnu cukerného metabolismu na transkripční úrovni transportérů
- Provéřít změnu cukerného metabolismu na úrovni transportu uhlíku
- Nalézt cukerné transportéry účastníci se výživy mykorhizního symbionta

3. Stav současného poznání

Nyní bych se rád rozepsal o stavu současného poznání na poli arbuskulární mykorhizní symbiózy a fyziologie této symbiózy zejména se zaměřením na rostlinnou stránku tohoto vztahu. Dále se zde zmíním o sacharidových transportérech, jelikož jsou podstatnou součástí toků sacharidů v rostlině. Na objevených funkcích některých transportérů u *Medicago truncatula* i jiných druhů popíšu strategie nakládání s cukry a předpokládané zapojení těchto systémů pro arbuskulárně mykorhizní symbiózu.

3.1. O arbuskulárně mykorhizní symbióze

Arbuskulárně mykorhizní symbióza (AMS) je v současnosti považovaná za nejstarší a nejrozšířenější formu symbiózy mezi rostlinami a houbami. Stáří této symbiózy je datováno až k prvním suchozemským rostlinám, protože známe fosilní doklad kolonizace psilofytní rostliny *Aglaophyton major* arbuskulárně mykorhizní houbou ze svrchního devonu, tj. vznik AMS datujeme hlouběji než před 400 mil. lety (Remy a kol., 1994). Arbuskule – typické vnitrobuněčné, stromečkovité struktury, které houba vytváří uvnitř kolonizovaných živých rostlinných buněk, daly tomuto typu mykorhizní symbiózy pojmenování. Dnes jsou nalezitelné u cca 80% druhů cévnatých rostlin – tato hojnost kolonizovaných, v symbiotickém vztahu žijících rostlin dává dokonce vznik hypotézy, že by měly být nemykorhizní podmínky vnímány jako nenormální pro většinu rostlinných druhů (Smith a Smith, 2012). Objevují se i názory, že z v důsledku přítomnosti specifických bakterií nebo prokaryotických endosymbiontů na nebo v AM myceliu lze pohlížet na arbuskulární mykorhizu jako tříčlenné společenství (Bonfante a Anca, 2009), zabývat se tímto hlediskem je však bohužel nad rámec této diplomové práce.

3.1.1. Fyziologie a anatomie symbiotického rozhraní

Za běžných podmínek se AM symbióza projevuje mutualistickou výměnou energie, hmoty a informací (přehledně popsáno např. v diplomové práci Pikorová, 2011 – kapitola 3 a 4). Ve zjednodušeném podání houba dodává rostlině minerální živiny, zejména fosfor, dusík, zinek a další mikroprvky, dále ovlivňuje hospodaření s vodou, zvyšuje obsahy fotosyntetických pigmentů i aktivitu fotosyntetických dějů, mění obsahy některých fytohormonů (auxinů, cytokininů, kyseliny abscisové, strigolaktonů, aj.) i sekundárních metabolitů (terpenoidů, fenylypropanoidů, fenolických kyselin i alkaloidů). Rostlina dává houbě na oplátku cukry.

Tento výměnný obchod je evolucí tak utužen, že jsou AM houby z oddělení *Glomeromycota* biotrofně závislé na uhlíku a energii přijímané od symbiotického partnera – rostliny – ve velmi vysoké míře! Přestože strážlivé odhady hovoří o spotřebě 3-5 % asimilátů (Řezáčová a kol., 2017), jsou naměřené i spotřeby čítající neuvěřitelných 20 % fotosyntézou vyprodukovaných asimilátů (Jakobsen a Rosendahl, 1990). Přestože je vyměňováno podstatné množství zdrojů a mluví se o tzv. dynamice biologického trhu, faktory regulující AM symbiózu jsou slabě pochopené (Walder a van der Heijden, 2015).

K výměně látek dochází právě v arbuskuli, tedy membránou arbuskule houba přijímá a vydává a rostlina činí totéž na membráně arbuskuli obalující (viz figura 3.1.1.). Vznik a funkce AM symbiózy je regulována oběma partnery a při vzniku arbuskulí dochází k velké reorganizaci uvnitř rostlinné buňky. Prvními pozorovanými změnami po vpuštění houbové hyfy do parenchymatické buňky je přestavba rostlinného cytoskeletu okolo vznikající arbuskule, smrštění vakuoly, množení organel a dekondezace chromatinu. Tyto změny dávají vznik symbiotickému rozhraní nazývanému periarbuskulární prostor či rozhraní, jehož tloušťka dosahuje až 100 nm. Rostlinná membrána – **periarbuskulární membrána** – je odvozena z plasmatické membrány, oproti které nese celou řadu rozdílných membránových proteinů, například H^+ /ATPázy nebo transportéry sacharidů, fosfátu a jiných látek. I přes velké znalosti ve složení periarbuskulárního proteomu zůstává přesné umístění přenosu uhlíku z rostliny do houby nejasné (Walder a van der Heijden, 2015).

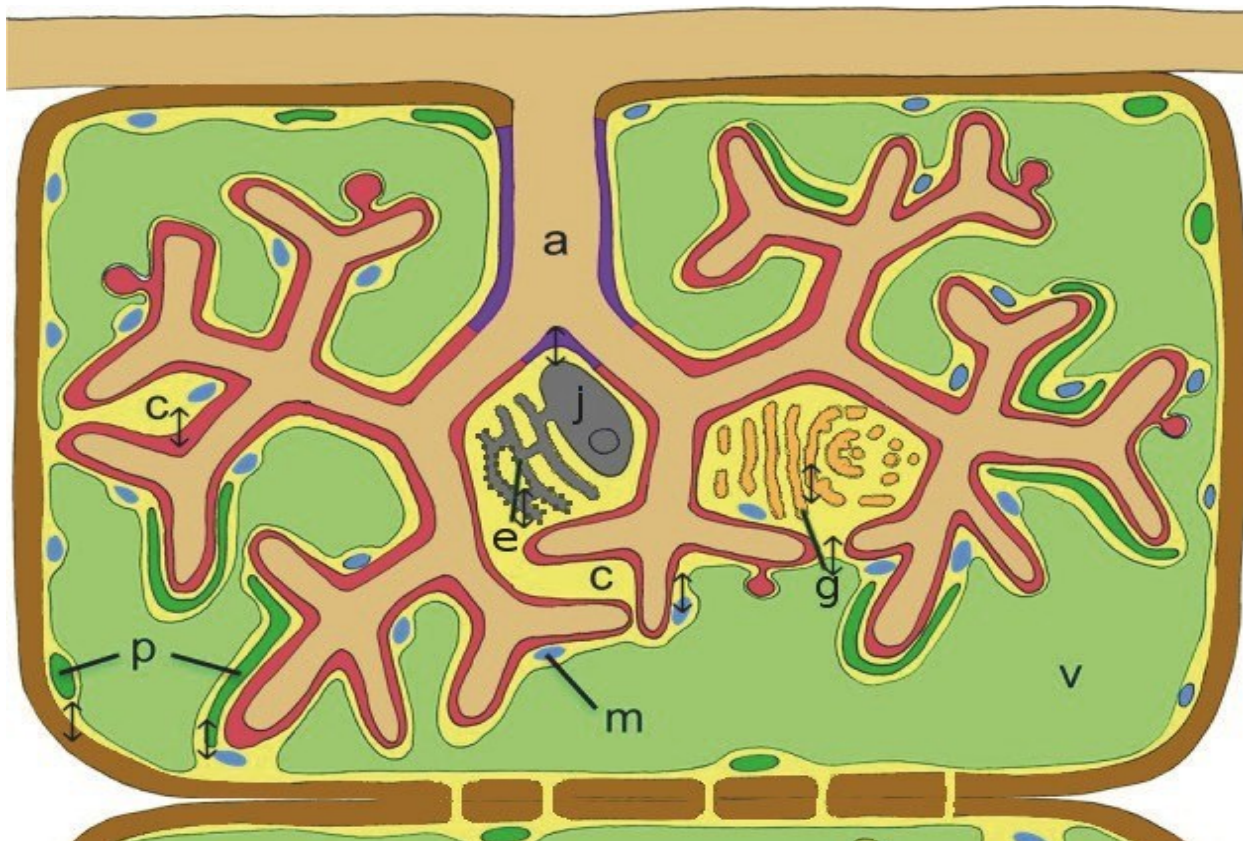
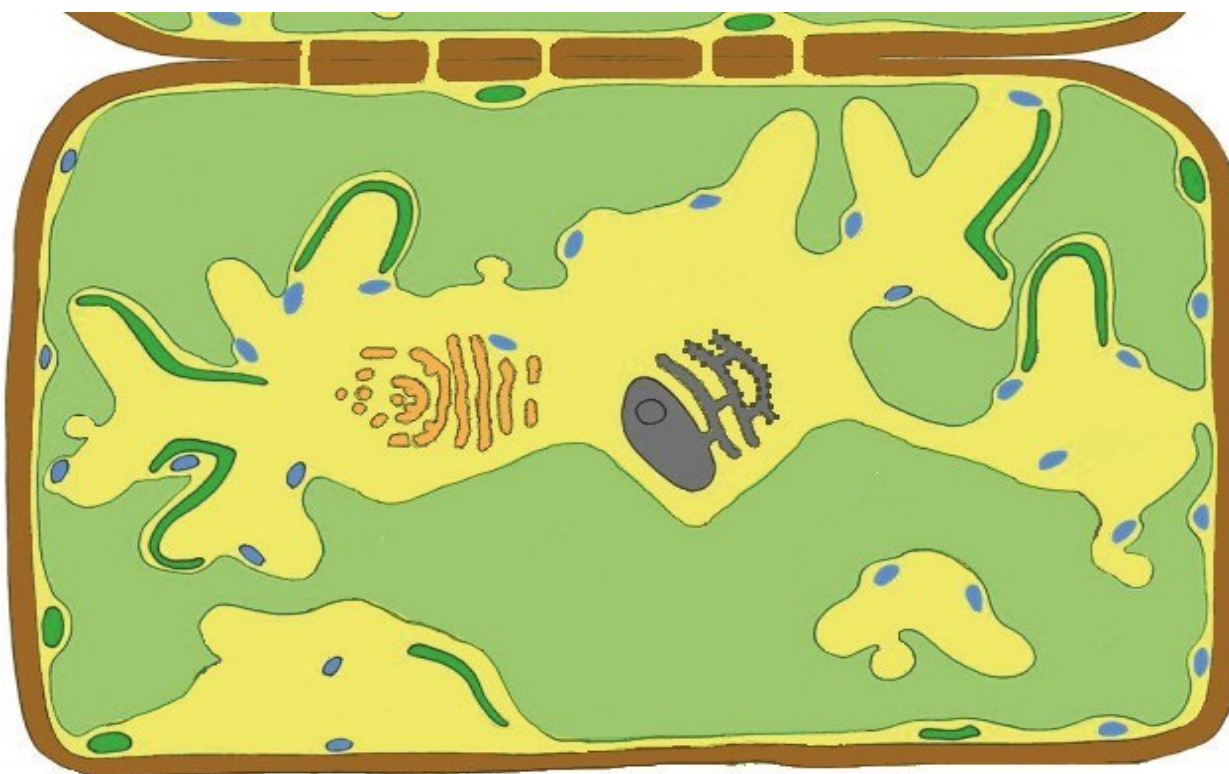


Figura 3.1.1.: Buňka primární kůry s arbuskulí (nahore) a bez arbuskule (dole).

Béžově – arbuskule (houbová cytoplazma); šedivě – jádro a endoplazmatické retikulum (ER); žlutě – cytoplazma; oranžově – golgiho aparát (GA); světle zeleně – vakuola; modře – mitochondrie; tmavě zeleně – plastidy; červeně – periarbuskulární prostor; fialově – apoplast u krčku arbuskule; tmavě hnědě – buněčná stěna. Šipky vyznačují možné umístění transportérů na membránách jednotlivých kompartmentů. Převzato od Bapaume a Reinhardt, 2012.



3.1.2. Biochemie periarbuskulárního rozhraní a blízkého okolí

Enzymy AM hub štěpící sacharózu nebyly doposavad identifikovány (Schaarschmidt a Hause, 2008), ale sacharóza je nejpravděpodobnější formou sacharidu, který rostlina transportuje přes periarbuskulární membránu směrem k houbě. Ta tak musí být štěpena rostlinnými enzymy – invertázami či sacharóza-syntázami (SuSy). Změny v expresi invertáz byly potvrzeny v buňkách obsahujících arbuskule (Blee a Anderson, 2002), ale i poblíž houbových struktur a ve floémových buňkách, kde je posílena akumulace transkriptu kódující apoplastickou invertázu i její aktivita (Schaarschmidt a kol., 2006). Přestože je exprese nejvíce navýšena v buňkách s arbuskulemi, je to obecným jevem kolonizovaných buněk AM kořene (Boldt a kol., 2011).

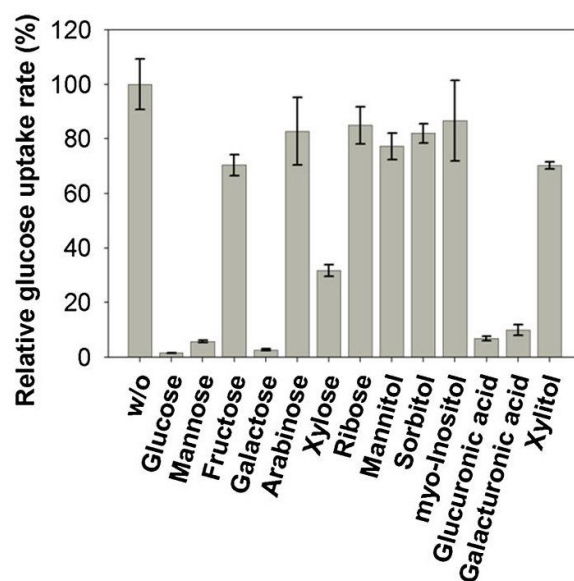
Rostlinná buňka však hospodáří s cukry v různých kompartmentech i pletivech, přesné závěry jsou proto složitější. Mimobuněčná, apoplastická invertáza přímo přináší hexózy apoplastickým houbovým strukturám (arbuskulí) a zvyšuje jímající schopnost AM kořenu, kdežto cytosolická invertáza a SuSy (Hohnjec a kol., 2003) zajišťují zásobování zvýšené energetické poptávky (kolonizovaných) kořenových buněk, aby zajistily vyšší metabolickou aktivitu a strukturní změny v rostlině, a vakuolární invertáza uvolňuje uložené cukry pro rostlinu i houbu zejména v brzkých stádiích (přehledně např. Schaarschmidt a Hause, 2008).

Význam apoplastické (periarbuskulární) invertázy je podložen zejména tím, že její snížená aktivita v kořeni, snižující tak hladinu hexóz v kořeni, vede k potlačené kolonizaci – pravděpodobně díky efektu hladovění houby – a to díky omezení štěpení sacharózy, nikoliv koncentrací hexóz v apoplastu jako takové (Schaarschmidt a kol., 2007a). Metabolismus je ale v AM kořeni posílen obecně a vede ke zvýšení hladiny sacharózy a fruktózy, nikoliv glukózy, v celém AM kořeni (Boldt a kol., 2011). Aktivace importní dráhy monosacharidů, spojené s přemístěním cukrů uložených ve vakuolách, může vyústit v obohacení cytosolu cukry v buňkách bez arbuskulí a tím pádem nepřímo krmit buňky s arbuskulemi symplastickou cestou (Casieri a kol., 2013).

Jednou z možností přenosu uhlíku do AM houby je ale také stále diskutovaný přenos lipidů, např. prostřednictvím 16:0 β -monoacylglycerolů (Bravo a kol., 2017).

3.1.3. Osud uhlíku (cukrů) v AM houbě

Nejpravděpodobnější formou uhlíku, kterou AM houba přijímá, jsou tedy hexózy a to zejména glukóza. Byl charakterizován houbový vysokoafinitní hexózový transportér MST2, který za příjem cukrů (glukózy, dále také galaktózy, manózy, glukuronové a galakturonové kyseliny, xyulózy a fruktózy, ale nikoliv sacharózy, maltózy ani polyolů; viz Obr. 3.1.3.) nejspíše zodpovídá (Helber a kol., 2011). Houba tvoří přímo (bez detekovatelných meziproduktů) ze dvou molekul redukujícího monosacharidu glukózy jednu molekulu neredukujícího disacharidu trehalózy (α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 1)- α -D-glucopyranosid); zásobním polysacharidem je pak glykogen (Bago a kol., 2000). Přijaté cukry jsou zpracovávány relativně rychle, protože do 24 hodin od značení stabilním izotopem ^{13}C je signál patrný v trehalóze i glykogenu (Shachar-Hill a kol., 1995). Ty jsou hlavními zdroji uhlíku a energie pro metabolickou aktivitu a glukózovou homeostázi vnitrokořenového mycelia (intraradikální), které mimo jiné živí mycelium mimokořenové (extraradikální). Potvrzena byla minimální schopnost extraradikálního mycelia přijímat sacharidy z média, a také byla potvrzena jeho téměř nulová lipogenní aktivita (Pfeffer



Obr. 3.1.3.: Substrátová specifita transportéru MST2. Převzato od Helber a kol., 2011. Osa y: relativní poměr příjmu glukózy (%).

a kol., 1999) – biosyntéza lipidů tak probíhá výhradně v intraradikálním myceliu a lipidy jsou následně translokovány do mycelia extraradikálního, kde mají úlohu jak zásobní, tak jsou z nich glukoneogenezi zpětně generovány jednotky glukózy a trehalózy. Velké množství hexóz je také využito v intraradikálním myceliu při respiraci a oxidativním pentóza-fosfátové dráze (Pfeffer a kol., 1999) a vlastně všech anabolických reakcích (tvorba polymerů buněčné stěny, nukleových kyselin či proteinů).

3.2. O cukerných přenašečích

Sacharidové transportéry, řidčeji a „více česky“ cukerné přenašeče, jsou transmembránové proteiny, které zprostředkovávají přenos sacharidů přes buněčnou membránu. Důležitá jsou zejména tři hlediska těchto proteinů: 1.) je můžeme rozdělit podle typu transportu, který zprostředkovávají – tedy zda cukry přenášejí jednosměrně či obousměrně a zda při tom spotřebovávají energii či fungují pasivně; 2.) na jaké membráně se nacházejí a tím pádem mezi jakými (mimo)buněčnými kompartmenty zprostředkovávají tok cukrů; 3.) jaké cukry přenášejí, tedy co je jejich substrátem. Tyto a jiné vlastnosti cukerných přenašečů budou v této kapitole rozebrány podrobněji. Také se dotkneme tématu nabývajícího na významu zejména v poslední době – některé transportéry, které bioinformaticky spadají do stejných skupin, totiž svou transportní aktivitu (při expresi v heterologním systému, např. kvasinkách) nevykazují a nabývají tak úlohy senzorů (Lalonde a kol., 1999), které pravděpodobně mohou velmi významně regulovat transportní aktivity skutečných přenašečů, jelikož tyto proteiny často (hetero)oligomerizují (viz níže).

3.2.1. Major Facilitator Superfamily – MFS

Většinu těchto transportérů řadíme do proteinové suproduiny MFS (Major Facilitator Superfamily – přeložil bych to jako „Hlavní nadčeď přenašečů“) zahrnující velkou škálu prokaryotních i eukaryotních membránových přenašečů malých rozpustných látek, zejména cukrů, aminokyselin, iontů (nitrátu, fosfátu, ...), ale i krátkých peptidů či xenobiotik (přehledně např. v Maiden a kol., 1987). Sdílejí společnou strukturu tvořenou 12 transmembránovými helixy s hydrofilní dutinou či kapsou uprostřed, ve které se nacházejí aminokyselinové zbytky, které zajišťují specifitu a následný přenos substrátu. Protein je typicky složen ze dvou 6 helixových polovin, které bývají propojeny velkou centrální smyčkou, ale hlavní opakující se jednotkou je nejspíše trojice helixů (Yan, 2013).

Nejvíce strukturních charakteristik mechanismu přenosu bylo provedeno na bakteriálních proteinech, zejména na fosfátovém a laktózovém přenašeči *Escherichia coli* (EcGlpT (Huang a kol., 2003), EcLacY (Abramson a kol., 2003; Kumar a kol., 2014)). Pro celou superroduinu a tudíž i pro rostlinnou biologii jsou však důležité strukturní charakteristiky provedené v posledních pár letech na houbovém fosfátovém přenašeči PiPT (Pedersen a kol., 2013), rostlinném nitrátovém přenašeči AtNRT1.1 (Sun a kol., 2014; Parker a kol., 2014) a lidském glukózovém přenašeči HsGLUT1 (Deng a kol., 2014). Pro tuto diplomovou práci však nejsou tyto strukturní charakteristiky důležité, proto se pouze občas o nějaké zmíním u konkrétních probíraných rodin.

Specifita přenášených látek bývá úzká a podle ní se často pojmenovává celá rodina, ale i tak tyto přenašeče často přenášejí látky další – v drtivém množství případů je to iont, který „nese“ chemickoosmotickou energii a je tak energetickým „platidlem“ umožňující sekundární aktivní transport substrátu proti jeho koncentračnímu gradientu. Při takovém kotransportu je pak daný iont samozřejmě také substrátem. Není ale vzácností, že je s různou afinitou přenášeno látek více druhů a dokonce známe proteiny, které mají spektrum přenášených látek velmi široké (typicky příslušné bakteriální proteiny rezistence, „multidrug transporters“).

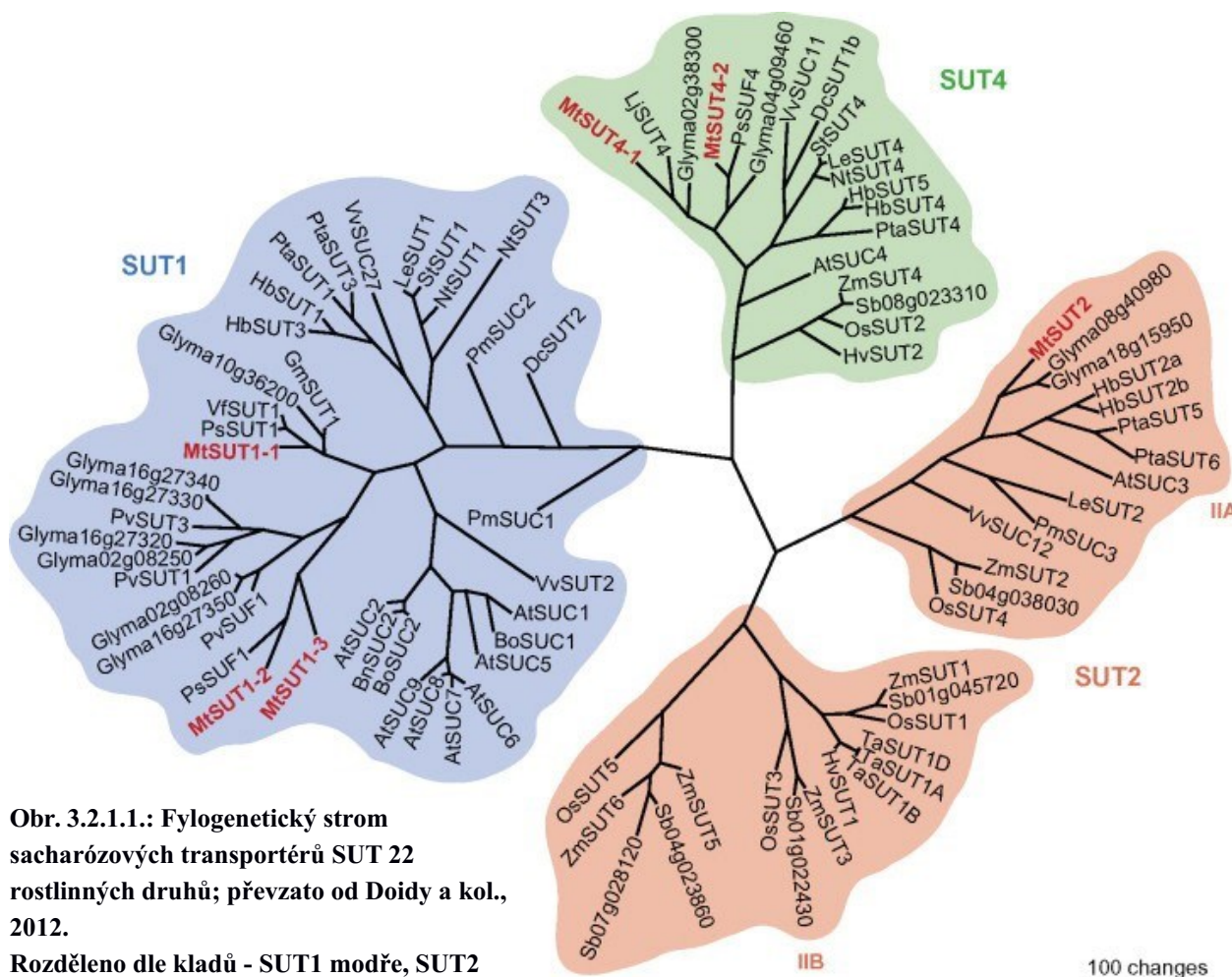
3.2.1.1. Sacharózové přenašeče – SUT

Rodina přenašečů sacharózy, hlavní transportní formy uhlíku v rostlině, je značena zkratkou SUT z anglického „SUcrose Transporter“. Použité mohou být i zkratky SUC (SUcrose Carrier)

nebo SUF (SUcrose Facilitator). Za použití fylogenetických metod lze rozřídít tyto přenašeče do 2 hlavních skupin o 4 kladech (viz Obr. 3.2.1.1.), ve kterých se vydělují větve, ve kterých se shlukují geny rostlin čistě jednoděložných a čistě dvojděložných. *M. truncatula* vlastní 6 genů pro přenašeče SUT: SUT1-1, 1-2, 1-3, 2, 4-1 a 4-2, přičemž SUT1-1 a 4-1 mají největší důležitost při nakládání a vykládání floému (Doidy a kol., 2012; viz kapitola 3.3. O rostlinném transportu).

Proteiny SUT jsou členy MFS a obsahují běžnou strukturu s 12 transmembránovými doménami, které pravděpodobně vytvářejí jeden pár pro sacharózu, kterou kotransportují s H^+ (Doidy a kol., 2012). První krok v reakčním cyklu rostlinných sacharózových transportérů je navázání protonu do dutiny přenašeče (Gieger, 2011). Poté se navazuje i sacharóza (hlavní substrát), transportér se překlápí a otevře tak svou dutinu na druhé straně membrány, čímž je dokončen přenos sacharózy. Afi sacharózových transportérů k sacharóze a protonu je signifi vyšší na hyperpolarizovaných membránách než na membránách depolarizovaných (Carpaneto a kol., 2005), což ústí ve zvýšenou rychlost transportu (Gieger, 2011) – u kukuřičného ZmSUT byla rychlost přenosu při negativním napětí na membráně stanovena na 500 molekul sacharózy za sekundu (Gieger, 2011). Protein AtSUC5 však zprostředkovává kromě transportu sacharózy i transport biotinu (Ludwig a kol., 2000).

Hlavní úlohou je však transport sacharózy, a to proti koncentračnímu gradientu. Nejznámějším příkladem je nakládání sacharózy z mezofylu listů do floému, důležité jsou ale i při uskladňování sacharózy ve vakuole během dne, čímž rostlina ulehčuje fotosyntéze – vysoká koncentrace sacharózy totiž snižuje fotosyntetickou aktivitu i potlačuje expresi fotosyntetických genů (Paul a Pellny, 2003), například syntézu a aktivitu RuBisCO (Lobo a kol., 2015). Přenašeče SUT lokalizující



do tonoplastu hrají významnou roli při zásobování semene při jeho vývoji a dalších, s reprodukcí spojených dějů (Griffiths a kol., 2016). Nejvíce sacharózy však „proteče“ floémem, zejména u apoplasticky nakládajících druhů (Weise a kol., 2000), kterým *M. truncatula* je. Proteiny SUT pak lokalizují do plasmalemy buněk sběrného floému (soubuní sítkovic a průvodních buněk) a nakládají sacharózu z apoplastu do floémové tekutiny (Lalonde a kol., 1999; Schepper a kol., 2013; Griffiths a kol., 2016).

Jedním z odhalených případů je vliv bramborového SISUT2 na formaci AMS nejspíše díky odčerpávání sacharózy z periarbuskulárního prostoru – toho je docíleno exocytózou endomembránových váčků obsahujících SISUT2 do periarbuskulární membrány a jeho lokalizací do membránových mikrodomén, což je ovlivňováno brasinosteroidovou signalizací (Bitterlich a kol., 2014). Jedním z interakčních partnerů SISUT2 autoři určili isomerázy disulfidických můstků (protein disulfide isomerase, PDI), které mohou zprostředkovávat dimerizaci SISUT2 se sebou samým (homodimerizace) či jinými membránovými proteiny (heterodimerizace) jedním či více disulfidickými můstky. To protřečí tvrzení, že se této reverzibilní, na redoxním statutu závislé dimerizaci neúčastní další faktory (Krügel a kol., 2008). Tito autoři však své pokusy prováděli v heterologním kvasinkovém systému – a proto tvrdí, že další faktory nejsou potřeba, protože ke změně cílení (StSUT1) do plasmatické membrány a v ní do raftům-podobných domén, zvýšení zastoupení jeho dimerní formy i zvýšení rychlosti transportu (V_{\max}) stačila změna oxidativního prostředí (nikoliv druhotný efekt na proton-motivní sílu) – nicméně *in vivo* bude situace složitější. Obecně tak lze shrnout regulaci proteinů SUT na změnu v buněčném redoxním statutu a protein-proteinovou interakci (Krügel a kol., 2013).

3.2.1.2. Monosacharidové přenašeče – MST

Transportéry přenášející jednoduché cukry – monosacharidy – jsou zkracovány jako MST (MonoSaccharide Transporters). V genomu *M. truncatula* bylo objeveno 62 genů pro monosacharidové přenašeče, což potrhne složitost analýzy přenašečů z této skupiny. Tyto proteiny aktivně přenášejí rozličné substráty (minimálně při expresi v kvasinkách – Harrison, 1996)) s různou mírou afinity a lokalizují do různých membrán, což vedlo k vytvoření 7 podrodin utvořených na základě fylogenetických analýz a společných znaků, zejména substrátových specifií a lokalizace. Například všechny tonoplastové přenašeče (TST nebo TMT) vykazují neobvykle velkou, centrální smyčku velkou zhruba 320 aminokyselin nacházející se mezi helixy 6 a 7 (Hedrich a kol., 2015).

Společně sdílené znaky jsou sdílené i napříč skupinami organismů, jak potvrzuje charakterizace houbového přenašeče z *Geosiphon pyriformis* - GpMST1 obsahuje 12 odhadovaných transmembránových domén a funguje jako H^+ kotransportér s nejvyšší afinitou pro glukózu, ale zvládá transportovat i manózu, galaktózu a fruktózu (Schüßler a kol., 2006). Strukturní charakteristiky jsou však tak jediné, na co se lze spolehnout. I v rámci jedné podskupiny totiž můžeme najít rozdíly, které zabraňují jednoduchému přenášení poznatků mezi druhy. AtTST1 a AtTST2 transportují glukózu a sacharózu do vakuoly výměnou za H^+ (Schulz a kol., 2011), kdežto BvTST2.1 z řepy (*Beta vulgaris*) takto nakládá pouze sacharózu (Jung a kol., 2015). Tyto výsledky nám tak boří i to základní, co o těchto přenašečích víme, tj. že přenáší (pouze) monosacharidy.

V neposlední řadě tak lze očekávat rozličnou škálu regulací. Protein MtST1 obsahuje cAMP- / cGMP-dependentní fosforylační místo, dále obsahuje 2 konsenzuální fosforylační místa pro kaseinovou kinázu II a tyto místa jsou konzervovány napříč rostlinnými transportéry (Harrison, 1996). Hospodaření s cukry v rámci rostlinných pletiv a buněčných kompartmentů objasňuje šíři genové rodiny monosacharidových transportérů v rostlinném genomu. Nepřekvapí proto, že změny v transkripci těchto genů bývají patrné například při environmentálních stresech, tedy situacích, které vyžadují mobilizaci a přesun energetických zásob a zároveň osmoticky a redoxně aktivních látek, kterými cukry jsou. Exprese AtTMT1 a AtTMT2 se zvyšuje v reakci na sucho, zasolení a chlad, ale také po přidání cukrů, a autoři odhadují funkci AtTMT1 na udržovatele cytosolické homeostáze glukózové koncentrace (Wormit a kol., 2006).

3.2.1.3. Plastidové přenašeče – GPT, PPT, EPT, NTT, XPT

Kromě monosacharidových cukerných přenašečů lokalizujících do plastidových membrán, shlukovaných do podrodiny pGlcT, existuje další řada přenašečů. Tyto přenašeče sdílejí shodný znak v podobě transportovaného substrátu – chovají se jako antiportery samotného fosfátu a fosforylovaného uhlíkového skeletu. Lokalizují na vnitřní membránu plastidů, ale kódovány jsou jaderným genomem.

Glukóza-fosfát translokátory (GPT) transportují glukóza-6-fosfát (G-6-P) výměnou za fosfát (Kammerer a kol., 1998) zejména v nezelených pletivech, kde mohou být využity pro oxidativní pentóza-fosfátovou dráhu (OPPP), syntézu škrobu, syntézu mastných kyselin nebo redukci nitritů (dusitanů). Při fylogenetické analýze vytváří vlastní skupinu odlišnou od savců i rostlinných, na plasmatické membráně lokalizovaných přenašečů glukózy (Weber a kol., 2000). Trióza-fosfát translokátory (TPT) exportují trióza-fosfáty z chloroplastů výměnou za fosfát a jsou důležité pro denní cestu uhlíku (Flügge, 1999). Fosfoenolpyruvát (PEP) translokátory (PPT) transportují PEP do plastidu výměnou za fosfát (Fischer a kol., 1997), kde je využit pro syntézu ATP, syntézu lipidů nebo do šikimátové dráhy. PPT listových chloroplastů funguje jako importér PEP do plastidu, kdežto PPT kořenových plastidů se chová jako přepouštěcí ventil (Staehr a kol., 2014). Nukleotidové transportéry (NTT) se trochu vymykají výše napsané podobnosti – transportují totiž nukleotid-difosfát a fosfát výměnou za nukleotid-trifosfát (ATT: $ADP + P_i / ATP$) (Trentmann a kol., 2008) a zajišťují import ATP do fotosynteticky neaktivních plastidů, tj. chloroplastů v noci a nezelených plastidů (Heldt, 1969; Schünemann a kol., 1993; Neuhaus a kol., 1997). Dobré je podotknout, že proteiny NTT obsahují i mitochondrie, ale ty si nejsou s těmi plastidovými strukturálně podobné (Flügge a kol., 2010). Existují i další přenašeče, které jsou bohužel méně charakterizované. Jednou skupinou jsou přenašeče pentóza-fosfátů výměnou za fosfát, např. translokátory xylulóza-fosfátu (XPT) (Eicks a kol., 2002).

Členové rodiny plastidových fosfátových translokátorů fungují jako dimery (Flügge, 1999) a většinou se objeví některý protein se zásadní fyziologickou funkcí a jiný aktivovaný mimořádnou událostí. Tak například u *Arabidopsis thaliana* byli objeveny dva geny pro NTT, přičemž AtNTT2 je exprimován téměř všude a zásobuje zejména nezelené plastidy pro anabolické dráhy, kdežto AtNTT1 vykazuje indukci v přítomnosti cukrů (Reiser a kol., 2004) – v tomto případě však antisense mutant pro AtNTT2 nebyl letální, neboť ATP může být generováno i jinými způsoby (Weber a Fischer, 2007). Samotné navýšení exprese StNTT může posílit hladiny nukleotidů v plastidu a ty mohou být využity pro syntézu škrobu (Zhang a kol., 2008). Současné a hlízově-specifické navýšení exprese GPT a NTT pak zvýšilo výnos hlíz (Zhang a kol., 2008) díky zásobením amyloplastů substráty pro produkci ADP-glukózy, což je limitující krok při syntéze škrobu. I u *A. t.* mají tyto proteiny úlohu v metabolismu uhlovlíků: AtGPT1 je exprimován podobným způsobem jako geny zapojené do metabolismu škrobu (Ruuska a kol., 2002) a hladiny mRNA pro AtGPT2 pro změnu odpovídají hladinám rozpustných cukrů, zejména glukózy (Kunz a kol., 2010), a AtGPT2 hraje zásadní roli v přerozdělování G-6-P mezi plastidy a cytosolem během přechodu z heterotrofní do autotrofní fáze růstu (Dyson a kol., 2014).

Medicago truncatula má anotované 3 geny jako GPT (GPT1 – MTR_4g131800 a dvakrát GPT-like – MTR_3g049400 a MTR_2g022700), přičemž MTR_2g022700 je dle MtGEA exprimován víceméně pouze při suchu, MTR_3g049400 téměř ve všech tkáních a MTR_4g131800, který byl dále zkoumán v této diplomové práci, vykazuje expresi v heterotrofních částech prýtu (internodiích, řapíku, pupenech), hypokotylu a v některých vzorcích kořenů a nodulí, dále také při infekci patogeny (*Aphanomyces*) i AM houbami

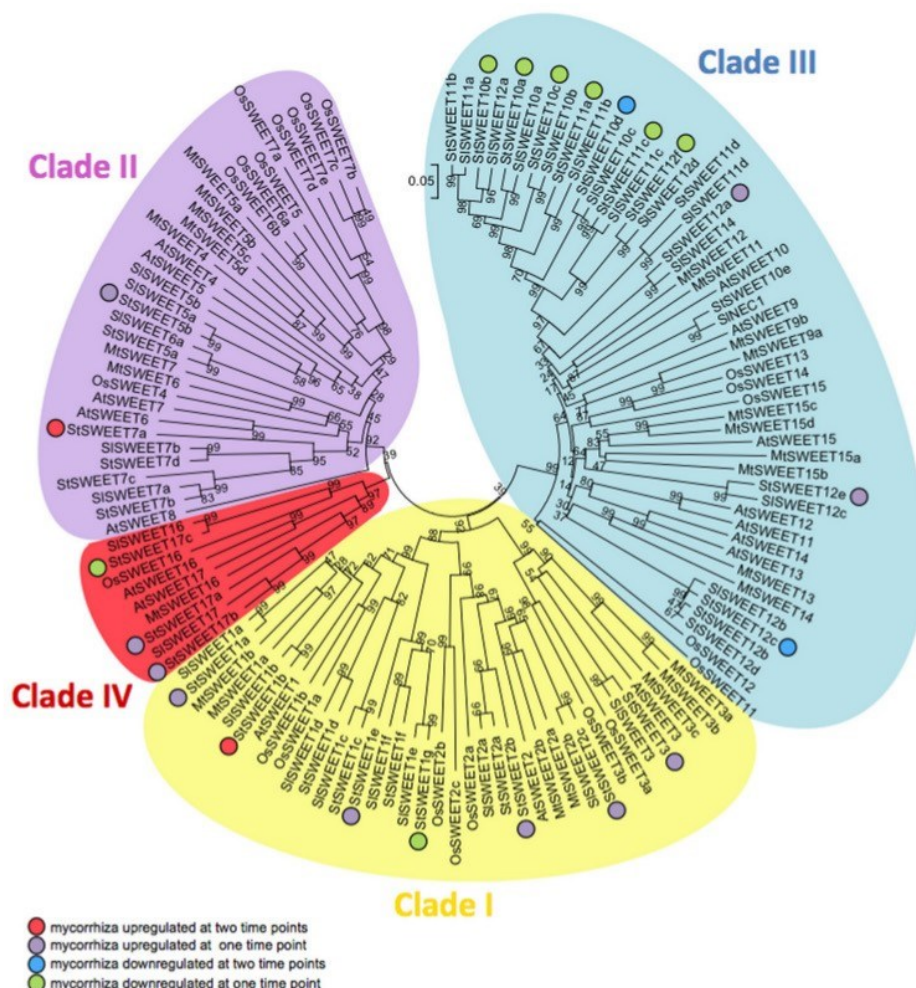
3.2.2. Obousměrné přenašeče SWEET

Proteiny SWEET jsou obousměrné, na pH nezávislé, nízko-afinitní uniportery sacharidů objevené nedávno u rostlin, bakterií i savců (Chen a kol., 2010; Chen, 2014).

Tyto obousměrné transportéry přenášející mono- i disacharidy pasivně, dle jejich koncentrace na tu či onu stranu. Zkratku získali z anglického „Sugars Will Eventually be Exported Transporters“, což je krkolomný název umožňující elegantní zkratku, ale také vystihuje jejich podstatu neprediko-

vatelnosti směru toku cukrů čistě z molekulárního hlediska. Konzervace proteinů SWEET dosahuje 39 % (Manck-Götzenberger a Requena, 2016) a na základě sekvenční podobnosti byly proteiny SWEET roztrženy do 5 kladů – z toho 4 rostlinných (Chen a kol., 2010; viz obr. 3.2.2.). Těmto skupinám byla přisouzena substrátová specifi – SWEET klad I transportuje glukózu (Ayre, 2011), klad III sacharózu (Chen a kol., 2012). Dále jsou očíslovány dle homologů v *Arabidopsis thaliana*, která tak má z defí od každého „SWEETu“ jeden, celkově 17. V některých čedích, např. u lil-kovitých (u bramboru bylo identifi 35 genů pro proteiny SWEET, u rajčete 29) došlo zřejmě ke zmnožení genů pro některé proteiny SWEET a jejich funkce je redundantní (Manck-Götzenberger a Requena, 2016), tudíž lze tuto charakteristiku očekávat i u 25 genů pro SWEET v *M. truncatula*.

Některé byly charakterizovány molekulárně: vakuolární AtSWEET17 transportuje fruktózu (Char-don a kol., 2013) a jeho exprese je fruktózou indukována, naopak je potlačována tmou (Guo a kol., 2014); SWEET9 je zodpovědný za výtok sacharózy v nektáriích (Eom a kol., 2015); u jiných byla alespoň lokalizována jejich exprese: StSWEET10a a StSWEET12c vykazují kořenovou specifi (Manck-Götzenberger a Requena, 2016). Jejich fyziologický účinek *in planta* je však složitější, než se na první pohled zdá. Protein AtSWEET1 může zprostředkovávat jak příjem glukózy přes plasmatic-kou membránu, tak její přenos do ER (Chen a kol., 2010), tudíž přesná lokalizace proteinu a vytvoře-



Obr. 3.2.2.: Fylogenetický strom přenašečů SWEET pěti rostlinných druhů; převzato od Manck-Götzenberger a Requena, 2016.

Rozděleno dle kladů - klad I žlutě, klad II fialově, klad III modře, klad IV červeně. Barevné body vyznačují geny se změněnou expresí při AMS: navýšená exprese ve dvou (červený) a jednom (fialový) časovém bodě, snížená exprese ve dvou (modře) a jednom (zeleně) časovém bodě.

ný tok cukrů je důležité prověřit ještě dalšími metodami. Za lokalizaci může být zodpovědná C-termi-nální část proteinu a její vzdálenost od transmembránového helixu (Wolfenstetter a kol., 2012).

Byla objevena i důležitost proteinů SWEET pro vykládání či předávání cukrů v symbiotických vztazích (Chen a kol., 2010). MtSWEET16 (klad IV: tonoplast) je jasně downregulovaný v buňkách s arbuskulí (Manck-Götzenberger a Requena, 2016), naopak StSWEET 1a a 1b, StSWEET7a a StSWEET12a svou expresi navýšily. Ze všech 35 StSWEETů žádný nevykázal mykorhizně-omezenou indukci exprese (Manck-Götzenberger a Requena, 2016). U *M. truncatula* jsou nej-spíše homologními MtSWEET1b, MtSWEET6 a MtSWEET 9b a dokonce vykazují dle MtGEA nejvyšší navýšení exprese v buňkách s arbuskulí (Manck-Götzenberger a Requena, 2016). Autoři proto soudí, že promotorové elementy a transkripční faktory řídící mykorhizní a / nebo arbusku-lární expresi SWEETů musí být konzervována v tolici i bramboru. Velkou důležitost také mají při parazitických vztazích. U rýže bylo zjištěno, že 5 proteinů SWEET z kladu III (OsSWEET11–15) je cíleno transkripčními aktivátory (TAL-efektory) bakteriálním patogenem *Xanthomonas oryzae* a tudíž jsou důležité pro náchylnost k této chorobě (Streubel a kol., 2013). U manioku *Manihot esculenta* jsou cíleny jeho 2 proteiny SWEET z kladu III (MeSWEET10 a 15), pro změnu TAL-efektory příbuzné *X. axonopodis* (Cohn a kol., 2014). Přenašeče SWEET transportující hexózy jsou cíleny u jiných druhů, např. vína (VvSWEET4; Chong a kol., 2014) či citrusu (CsSWEET1; Hu a kol., 2014), zajišťující tak obecně dostatek sacharidů pro výživu patogena (přehledně Chen a kol., 2010 a Eom a kol., 2015).

3.3. O rostlinném transportu

V rostlinném těle dochází neustále k tokům látek. Pokud se podíváme na toky sachari-dů, je vhodné začít v místě jejich vzniku, tj. ve zdrojových pletivech, především v buňkách listového mezofylu. V cytoplazmě těchto buněk je (z asimilátů chloroplastu) produkována sacharóza, která je přijata tzv. nákladním fl dopravena transportním fl do míst spotřeby, kde je vykládacím fl uvolněna do pletiva. Tato základní cesta je uskutečni-telná prostřednictvím různého buněčného uspořádání jednotlivých pletiv, od čehož se odvíjejí zapojené transportéry.

3.3.1. Nakládání do floému

Základní dvě dělení možného toku cukrů (látek) je symplastická cesta, tj. tok skrze plas-modesmy jednotlivých buněčných typů také přímo do sítkovic, a apoplastická cesta, tj. před samotným naložením do fl je sacharóza z buněk transportována do apoplastu, ze kterého ji fl nakládá (přehledně např. v Atkins a Ruan, 2016). U symplasticky nakládajících druhů, mezi něž patří skupiny evolučně starší, stromy, keře a rostliny tykvovité (van Bel, 1993), je cytoplasmatické kontinuum funkční od mezofylových buněk po sítkovicové elementy. U apo-plasticky nakládajících druhů končí symplastická cesta typicky v parenchymatických buňkách cévního svazku, ze kterých sacharóza vytéká do apoplastu. U huseníčku byly identifi-proteiny SWEET z kladu III (AtSWEET11 a AtSWEET12; Chen a kol., 2012) jako kandidátní přenašeče umožňující export sacharózy z parenchymatických buněk cévního svazku. Z apoplas-tického prostoru je aktivně přenášena do průvodních buněk a odtud opět symplasticky do ele-mentů sítkovic. Přestože je těžké osvětlit, jakou transportní cestu rostlina využívá – a zda pouze jednu, vyřazení některých kroků (transportérů zodpovědných za fungování některého kroku) dává nahlédnout na preference daného rostlinného druhu. Lze však očekávat rozdíly během vývoje pletiv a možná i v průběhu dne.

Do sítkovic je sacharóza přenášena z průvodních buněk. Obecně je pro tuto úlohu rekruto-ván transportér SUT z kladu 1, u *M. truncatula* je to MtSUT1-1 (Doidy a kol., 2012). Ortologní floémové nakladače byly objeveny např. u bramboru (StSUT1, Riesmeier a kol., 1994), tabáku

(NtSUT1, Bürkle a kol., 1998), a huseníčku (AtSUC2, Gottwald a kol., 2000). Tyto poznatky přispívají k myšlence, že *M. truncatula* je apoplasticky nakládající druh (viz grafika). Aktivní přenos cukrů do komplexů průvodních buněk a sítkovic umožňuje navyšování koncentrace ve floému. Při přenosu je spotřebovávána energie z gradientu vodíkových kationtů, jelikož proteiny SUT kontrahují sacharózu s H^+ . Gradient je vytvářen H^+ /ATPázami umístěnými na plasmatické membráně zejména průvodních buněk (Giaquinta, 1979; Bouche-Pillon a kol., 1994; DeWitt a Sussman, 1995). Druhý vysoce exprimovaný gen kódující sacharózový přenašeč je tonoplastový MtSUT4-1, který vykazuje navýšenou expresi při AMS v prýtu i kořeni (Doidy a kol., 2012). Pravděpodobně přenáší sacharózu společně s H^+ z vakuoly do cytoplazmy – obdobně jako ortolog LjSUT4 blízce příbuzného štirovníku (Reinders a kol., 2008).

Export fotoasimilátů z může být limitující jak ze zdrojové strany, tak ze strany spotřeby (Wardlaw, 1990): asimilátů může být produkováno hodně, ale jímající orgány nemusí zvládat toto množství přijímat. Obdobně sinkové orgány mohou vyžadovat větší přísun asimilátů, ale zdroj není schopen tomuto požadavku rychle vyjít vstříc. Rostliny většinou mívají dostatek světla, obzvlášť v experimentálních systémech pod umělým osvětlením, tudíž nejčastější limitací bývá nízká kapacita jímky. Navýšení toků cukrů z produkčních listů lze tedy docílit navýšením spotřeby, např. produkcí ovoce (Moorby a Jarman, 1975). Při posílení kapacity současně zdroje i jímky lze docílit dokonce dvojnásobného výnosu bramboru (Jonik a kol., 2012). Informace o zvýšené spotřebě je přenášena tlakem floémové tekutiny a prostřednictvím fytohormonů.

3.3.2. Vykládání z floému

Pod tímto termínem se rozumí cesta asimilátů ze sítkovic do buněk přímé spotřeby. Cestu lze ještě užeji rozdělit na vykládání ze sítkovic a transport asimilátů v rámci jímajícího pletiva. Cílem toku asimilátů mohou být rozličné orgány – jak nadzemní v podobě rostoucího prýtu (zejména nových listů), květů, semen a plodů, tak podzemní v podobě kořenů, oddenků, hlíz, ale i symbiotických partnerů. Díky tomu lze v jedné rostlině nalézt vícero vykládacích způsobů zároveň. U apoplastické cesty vykládají průvodní buňky sacharózu (či jiný transportní asimilát) do floémového apoplastu, odkud je přijímána jímajícími buňkami. Symplastická cesta využívá cytoplazmatického kontinua a asimiláty tečou přímo do místa spotřeby skrze plasmodesmata. Tato cesta může být přerušena apoplastem dále než ve floému, což je typické pro zásobování semen a symbiotická rozhraní. Symplastická cesta tak bývá ukončena v buňce, která přímo sousedí s buňkami semene či symbionta.

Symplastická cesta se uplatňuje zejména za podmínek vysokého podílu asimilátů ve zdroji ku sinku (Patrick a Offler, 1996). Typickými orgány využívající tuto cestu pak jsou apikální a kořenové vrcholy, buňky stonku a kořene, hypokotyl a epikotyl. Výhodou symplastické cesty oproti té apoplastické je vysoký, i o řád vyšší tok asimilátů (Patrick a Offler, 1996) a zároveň existenci apoplastické bariéry v některé buněčné vrstvě (kořenů), což zajišťuje selektivní příjem látek z půdního prostředí. Tato cesta se však může změnit v průběhu vývoje orgánu, jako bylo objeveno u rajčete: mladé plody rajčete (2 týdny po květu) také využívají symplastickou cestu příjmu sacharózy, ale během následujících 10 dnů přepínají na apoplastickou cestu příjmu hexóz, což odpovídá fázi akumulace sacharidů (Ruan a Patrick, 1995). Symplastická cesta je totiž citlivá na osmotický tlak, který narůstá právě ve fázi akumulace zásob, a přepnutím na apoplastické vykládání (vložením apoplastického rozhraní do symplastické cesty – například uzavřením plasmodesmat) je docíleno nezávislosti floémového toku na metabolické aktivitě (či kompartmentalizaci) jímky. Lze však nalézt i opačný případ – přechod z apoplastického vykládání na symplastickou cestu – ke kterému dochází v různých částech stolonu při tuberizaci bramboru (Viola a kol., 2001).

Apoplastické rozhraní poskytuje dostatečný koncentrační gradient asimilátů k tomu, aby nebylo potřeba je vykládat aktivně. Starší zdroje uvádějí, že naměřené charakteristiky připomínající pasivní difúzi jsou důkazem k tomu, že přenos není zajišťován přenašeči (Patrick a Offler, 1996),

ale dnes víme, že pasivní přenos sacharidů přes membránu zajišťují přenašeče z rodiny SWEET. Uspořádání transportních proteinů na membránách jednotlivých buněk je tak podobné jako bylo objeveno u nakládání (viz grafika).

3.3.3. Využití asimilátů

Cílové, jímající buňky asimiláty využívají několika způsoby. Předně jsou sacharidy spotřebovány v rámci udržovacího metabolismu, tj. prodýchány v respiračním metabolismu. Další možností využití přinesených asimilátů jsou růstové děje. Rostlinná buňka v základu tvoří strukturní polysacharidy, membrány a proteiny, k čemuž využívá právě energii a uhlíkové skelety. Pro růst rostlinné buňky je také důležité zajištění expanze skrze turgorový tlak vakuoly. Kromě transportu iontů lze vakuolu zvětšovat právě akumulací sacharidů. Tento jev se prolíná s funkcí zásobní. Spotřební orgány (buňky) některou z těchto aktivit odebírají transportované sacharidy a tím snižují jejich koncentraci, což udržuje gradient umožňující jejich transport na dlouhé tratě skrze fl i krátké vzdálenosti mezi sousedními buňkami. Kompartimentalizace sacharidů do vakuoly je právě tímto případem, stejně jako přenos do plastidu a následná syntéza škrobu. Stejný osud potká transportní sacharidy v případě, že nekončí v buňce rostlinné, ale jsou dále předány buňkám bakteriálním či houbovým.

Buňky primární kůry obsahující arbuskuli jsou tak speciálním cílem transportu sacharidů, neboť mají zvýšenou poptávku po sacharidech v rámci sousedství buněk stejného pletiva. Expresní analýzy pouze buněk s arbuskulemi v porovnání s buňkami bez arbuskulí ukazují, že jejich transkriptomy jsou odlišné (Gomez a kol., 2009; Gaude a kol., 2011; Hoge Kamp a kol., 2011; Gaude a kol., 2012; Hoge Kamp a Küster, 2013). Otázkou však je, zda jsou skutečně odlišnými buněčnými typy navzájem spolupracujícími nebo je to pouhý artefakt a viděné rozdíly jsou rozdílem v časovém průběhu diferenciace buněk s arbuskulí. Změny v transkriptomech těchto buněk jsou však tak velké, že sousedící buňka bez arbuskule musí procházet jakousi formou diferenciace, i kdyby se na budoucí arbuskuli nepřipravovala (nac arb cor.png). Například expresní analýza MtSUT4-1 pomocí GUS lokalizace ukázala, že MtSUT4-1 je v kořeni exprimován v buňkách sousedících s kolonizovanými buňkami (Gaude a kol., 2011). Soudí se tedy, že je zodpovědný za mobilizaci vakuolárních zásob sacharózy a za nepřímé zásobování symbiotických partnerů – rhizobií i AM hub – sacharózou.

3.4. Minerální živiny a arbuskulárně mykorhizní symbióza

Minerální živiny včetně vody jsou tím, co rostlina získává v mutualistickém vztahu s arbuskulárně mykorhizní houbou. V některých případech byly objeveny specifické geny kódující transportéry exprimující se výhradně v periarbuskulární membráně. To činí záležitost kolem minerálních živin mnohem jednodušší oproti transportu cukerných přenašečů.

Zmíním zde pouze některé prvky, které se nějakým způsobem dotýkají mých kandidátních genů prozkoumávaných v této diplomové práci. Fosfátový přenašeč je důležitým indikátorem funkční symbiózy, draslík je řekněme opomíjenou součástí AMS a má blízký vztah se sodíkem. Díky zajímavé expresi symportéru Na⁺ a močoviny jsem tak musel okrajově zabývat i metabolismem dusíku.

3.4.1. Fosfor

Příjem fosforu u mykorhizních rostlin je velmi dobře prozkoumán (přehledně např. v mé bakalářské práci: Konečný, 2014). Pravděpodobně to je skutečností, že fosfor se vyskytuje (ať už vázaný či volný) v podstatě pouze v jedné formě fosfátových aniontů – PO₄³⁻, případně hydrogennovaných forem HPO₄²⁻ a H₂PO₄⁻ v závislosti na pH. Jeho dostupnost v půdním roztoku je nízká, protože fosfáty adsorbují na minerální částice. V blízkém okolí kořene tak vzniká zóna vyčerpání. Menší a dále sahající houbové hyfy jsou tak schopnými příjemci půdního fosforu a ten pak smě-

ňují s kolonizovanou rostlinou. Mimokořenové mycelium vytváří polyfosfáty, které se společně s argininy transportuje do vnitrokořenového mycelia. Zde dochází k hydrolýze polyfosfátů a jejich výtok do periarbuskulárního prostoru.

Tato tzv. mykorhizní cesta příjmu fosforu má důležitý společný znak pro AMS: rostlina exprimuje speciální gen pro fosfátový transportér, který je lokalizován výhradně na periarbuskulární membráně a zodpovídá za příjem fosfátů od AM houby – u *M. truncatula* je to MtPT4 (Harrison a kol., 2002). Navíc tento transportér není exprimován, pokud je rostlina v nemykorhizních podmínkách. Jeho zvýšená exprese (zapnutí) je tak jedním z referenčních genů pro úspěšnou a hlavně funkční AM symbiózu (Javot a kol., 2007a).

3.4.2.Draslík

Jeden z důležitých makroprvků je v rostlině obsažen většinou ve 2-5 % suché biomasy. Vyskytuje se v podobě draselných kationtů (K^+) a jeho buněčná koncentrace se typicky pohybuje mezi 80-200mM, ale v půdě je špatně dostupný a též vznikají zóny vyčerpání (přehledně Moody a Bell, 2006) – koncentrace draslíku v půdním roztoku se pohybuje v řádu 0,1–1 mM (Asher a Ozanne, 1967), což je mnohem méně, než koncentrace v běžně používaných hnojivech (3,75 mM-13,15 mM; Smith a kol., 1983).

Dostatečné a pravidelné zásobení rostliny draslíkem je však důležité pro její zdravý růst a vysoké výnosy zemědělských plodin, včetně odolnosti proti škůdcům či odolnosti proti abiotickým stresům.

Jeho důležitost pro udržování správného elektrochemického prostředí v buňce (tj. pH, membránového potenciálu i turgoru) a pro aktivitu zhruba 60 enzymů (Suelter, 1985), nejenom proteosyntetických a fotosyntetických, nutí rostliny vlastnit velkou škálu draselných přenašečů ve svém genomu. Pro cukerný metabolismus je úloha draslíku stěžejní v několika úlohách při fotosyntéze, syntéze škrobu a vyrovnávání změn membránového potenciálu při kotransportu cukrů a H^+ , což nejvíce ovlivňuje floémový transport sacharidů.

Arbuskulárně mykorhizní rostliny akumulují více draslíku v tkáni. Takové výsledky byly publikovány pro hvězdníčku slaničnou (*Aster tripolium*) (Scheloske a kol., 2004), centrální válec kořene u kukuřice seté (*Zea mays*) (Kaldorf a kol., 1998), prýt muškátu (pelargonie štítnatá - *Pelargonium peltatum*) (Perner a kol., 2007), listy salátu (ločiky seté - *Lactuca sativa*) (Baslam a kol., 2013) a stébla pšenice (*Triticum aestivum*) (Oliveira a kol., 2016). Obecně je ale téma AMS a draslíku relativně nové a neprobádané (přehledně např. Garcia a Zimmermann, 2014).

Nicméně v prýtu tolíce *M. truncatula* byla koncentrace K^+ shodná mezi M+ a NM rostlinami (Garcia a kol., 2017): Snížená dostupnost draslíku (0,05 mM oproti 3,75 mM) po 6 týdnů kolonizaci v průměru nesnížila, pouze zvětšila rozptyl dat, a snížila expresi referenčních genů funkčnosti symbiózy (MtPT4, RAM1 a 2, STR). Mykorhizní rostliny také zachovávaly hladinu reaktivních forem kyslíku (ROS) na nízké hladině plně hnojených rostlin, kdežto nemykorhizní rostliny při nedostatku K^+ vykazovaly vysoký obsah ROS. Toho, zdá se, docílily především změnou transkripce genů zodpovědných za udržování redoxní homeostáze při oxidativním stresu – včetně snížení transkripce genů zodpovědných za produkci ROS.

3.4.3.Sodík

Sodné kationty – Na^+ – nemají pro rostliny vysokou důležitost. Pro většinu rostlin je sodík pouze tzv. benefičním prvkem poskytující některé výhody při nízké koncentraci, ale při koncentracích vyšších působí toxicky osmotickým působením a interakcí s funkcemi K^+ . Sodné kationty kompetují s vazebnými místy enzymů pro draslík a tím snižují enzymatickou aktivitu a proteosyntézu, také využívají transportéry pro K^+ a zvyšováním své koncentrace v buňce brání efektivnímu vstřebávání dalšího K^+ do buňky. Typická obrana je tudíž akumulace Na^+ v apoplastu a vakuole.

Vysoké koncentrace sodíku snášejí zejména rostliny s C4 metabolismem, ale většina hospodářsky důležitých plodin je k sodíku citlivá (natrobovní) a tudíž je studována zejména oblast odolnosti těchto rostlin k tomuto prvku či zasolení obecně. Arbuskulárně mykorhizní houby zlepšují odol-

nost rostlin ke stresu ze zasolení chloridem sodným, což bylo popsáno u bazalky pravé (*Ocimum basilicum*) (Zuccarini a Okurowska, 2008), olivy (olivovník evropský - *Olea europaea*) (Porras-Soriano a kol., 2009), a kukuřice (*Z. mays*) (Estrada a kol., 2013b). Dle výsledků z emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem obsahovaly AM rostliny výrazně nižší koncentraci Na^+ v prýtu *M. truncatula* (Garcia a kol., 2017) a autoři nabízejí vysvětlení, že houbový symbiont Na^+ přijímá a tím pufruje a snižuje koncentraci sodíku v rostlině.

3.4.4. Dusík

Arbuskulární houba přijímá dusík z půdy mimokořenovým myceliem hlavně v anorganické formě amonných iontů NH_4^+ , např. vysokoafinitním přenašečem GintAMT1 ($K_m = 26 \mu\text{M}$, López-Pedrosa a kol., 2006), ale také může přijímat aminokyseliny přímo, zejména ty hydrofobní, jak bylo prokázáno u aminokyselinové permeázy z *G. mossae* GmosAAP1 nejlépe přenášející prolin (Capelazzo a kol., 2008). Je schopná je získávat přímo z organických materiálů, např. rozkládajících se listů travin (Hodge a kol., 2001; Leigh a kol., 2009) a bylin či chitinu (Jansa, nepublikovaná data). Amonné ionty jsou v buněčném prostředí zabudovávány do aminokyselin, zejména do glutaminu a následně do argininu, který je hlavní transportní formou do vnitrokořenového mycelia. Zde je arginin rozkládán a dusík je předáván rostlině. Tato cesta je podpořena mimojiné transkripčními daty, která potvrzují odlišnou lokalizaci asimilujících a degradujících enzymů (Govindarajulu a kol., 2005).

Močovina je jednou z možných forem účastníků se přenosu dusíku z houby do rostliny a rostlina ji může snadno zpracovat pouze enzymem ureázou (jediným doposud známým rostlinným enzymem s nikelnatým kationtem Ni^{2+} jako kofaktorem), který močovinu rozštěpí a vzniklý amoniak fixuje glutamin syntetázou (GS) za spotřeby ATP (Sirko a Brodzik, 2000). Také se nabízejí jiné cesty fixace amoniaku přes enzymy glutamát dehydrogenázu (GDH) či glutamin 2-oxoglutarát aminotransferázu (GOGAT), které většinou spotřebovávají redukční ekvivalenty NADH. Při analýze obsahu primárních metabolitů v buňkách s arbuskulí byl zjištěn nárůst aminokyselin glutamátu, glutaminu, aspartátu i asparaginu v M+ kořeni (Gaude a kol., 2015). V literatuře se ale objevuje názor, že formou dusíku přenášenou v periarbuskulárním rozhraní je již amonný iont (NH_4^+ , v širším slova smyslu včetně amoniaku NH_3 , který bývá popisován v reakcích, ale díky nízkému pH v periarbuskulárním prostoru bude pravděpodobně hbitě protonován), tudíž k rozkladu močoviny musí docházet již v houbě či v periarbuskulárním prostoru (Chalot a kol., 2006) a následnému příjmu amonných iontů, jak bylo popsáno u štirovníku (*Lotus japonicus*) včetně kandidátního transportéru LjAMT2;2, který pravděpodobně váže NH_4^+ v periarbuskulárním prostoru a uvolňuje NH_3 v rostlinné cytoplazmě (Guether a kol., 2009b), a pravděpodobný homolog u *M. truncatula* MtAMT1 (Gomez a kol., 2009) vykazující velice podobný expresní profil jako MtPT4. Amoniak je pro většinu buněk toxický, proto musí dojít k jeho rychlé fixaci. Vnitrokořenové mycelium vykazuje sníženou expresi genu pro GS (Govindarajulu a kol., 2005), tudíž houbový partner není tím, kdo amoniak zpětně vstřebává – naopak amoniak uvolňuje. To lze potvrdit expresí arginázy a ureázy (katabolické větve ornitinového cyklu) (Cruz a kol., 2007; přehledně pak Jin a kol., 2012) a navýšením enzymatické aktivity po přidání sacharózy do média (Fellbaum a kol., 2012), což zároveň poukazuje na zajímavý mechanismus propojení cukerného a dusíkového metabolismu prostřednictvím změny exprese houbových genů.

4. Materiál a metody

4.1. Modelové organismy

4.1.1. *Medicago truncatula*

Modelovou rostlinou experimentů je *Medicago truncatula*, menší zástupce rodu tolíce, která je tak vzrůstem spíše podobná jeteli (*Trifolium*). V angličtině (a zejména v anglicky psané, odborné literatuře) se nejčastěji používá pojmenování „barrel medic“. České pojmenování jí schází – nicméně u jiných druhů se *truncatula*, z latiny „utnout“ či „zkrátit“, překládá do druhových názvů „malý“ či „uťatý“. Domovem této jednoleté pícniny jsou středomořské končiny, ale pro svou hospodářskou důležitost je pěstována po celém světě, zejména v Austrálii (Frame, 2005). Je odolná k abiotickým stresům, zejména k suchu, a svým bujným a rychlým růstem pomáhá zemědělcům zkvalitňovat půdní charakteristiky, fixovat do půdy vzdušný dusík či krmit dobytek. Pro mou experimentální práci je však důležitá její úloha modelové rostliny (Cook, 1999; Tivoli a kol., 2006; Rose, 2008), tj. její genetika, vývojová biologie a symbiotické vztahy, které umí navazovat, což jí činí velice důležitou i pro práci jiných experimentálních biologů rostlin s možností přenést nabyté poznatky do jiných druhů bobovitých rostlin hospodářsky důležitějších – od tolíce vojtěšky po klasické luštěniny jako sója, hrách, čočka, fazol a podzemnice.

M. truncatula má relativně malý, diploidní genom, jehož 460 Mbp je zapsáno na 16 chromozomech. Díky mezinárodní spolupráci byl genom *M. t.* kultivaru Jemalong A17 osekvenován již v roce 2011 (Young a kol., 2011). Od roku 2014 je používána genomická verze 4.0 (Tang a kol., 2014), která je využívána v komerčních nástrojích.

Známostí je utváření mutualistických symbiotických vztahů s dusík fixujícími (diazotrofními) bakteriemi a arbuskulárně mykorhizními houbami. Jelikož modelová rostlina číslo 1 – *Arabidopsis thaliana* – není těchto symbióz schopna, ale mykorhizní symbiózy jsou hojně rozšířeny, je *M. truncatula* modelovou rostlinou i v této oblasti. Navíc je schopna tyto vztahy regulovat podle užitku, který z něj má. Bakteriální vnitrobuněčná symbióza je pravděpodobně umožněna dávnou celogenomovou duplikací před 58 miliony let (Pfeil a kol., 2005), čímž se zdvojily (a pro evoluci uvolnily) mykorhizní symbiotické geny a nyní regulují tvorbu tzv. hlízek - nodulací. Nicméně přímá spojitost genomové duplikace a schopnosti nodulovat je sporná (Cannon a kol., 2010).

4.1.2. *Sinorhizobium meliloti*

Tato gramnegativní bakterie z třídy alfa proteobakterií vykazuje diazotrofní chování - fixuje vzdušný dusík (N_2) na amoniak ($2 NH_3$) pomocí enzymu nitrogenázy. Fixace je energeticky velmi náročná (na jednu molekulu dusíku se spotřebuje 16 ATP) a nitrogenáza je citlivá na přítomnost kyslíku, proto k ní dochází zpravidla pouze v kořenových hlízkách (nodulech) rodů tolíce (*Medicago*), komonice (*Melilotus*) a pískavice (*Trigonella*). Vznik hlízky je kontrolován oběma symbionty. Za kompatibilitu symbiontů zodpovídají bakteriální Nod faktory, které rostlina rozpoznává, a lektiny vázající bakteriální buňky ke kořenovým. Její genom veliký 3,6 Mbp byl sekvenován roku 2001. V tomto pokusu byly bakterie přítomny v obou variantách.

4.1.3. *Rhizophagus irregularis*

Tato arbuskulárně mykorhizní houba z čeledi *Glomeraceae* byla v roce 2009 přejmenována, respektive vydělena od původního rodu *Glomus* (Stockinger a kol., 2009). Je rozšířena patrně ve všech půdách a díky dobré kolonizaci hostitelských rostlin je využívána pro cílené inokulace (Mathimaran a kol., 2005).

4.2. Zakládání pokusu

Substrát byl složen z autoklávovaného písku a zeolitu s příměsí γ -ozářené (> 25 kGy) půdy získané v Litoměřicích (blíže popsané v Řezáčová a kol., 2016) – výsledný poměr složek byl 45 : 45 : 10 písek : zeolit : půda – a malým množstvím nemykorhizního či mykorhizního inokula. Obě inokula byla pěstována v substrátu stejného složení na rostlinách póru (*Allium porrum*), tudíž obsahovala živé mikrobiální společenstvo a kořeny póru. V mykorhizní variantě byla přítomna i mykorhizní houba *R. irregularis*, což jsem ověřil mikroskopicky (viz barvení kořenů). Kořeny póru se substrátem (z několika květináčů) jsem mechanicky rozstříhal a 90 g promísil s 900 ml substrátu (10 % objemu substrátu), čímž vznikl inokulovaný substrát. Na dno nového, plastového, 96% etanolem sterilovaného květináče jsem vložil 96% etanolem sterilovanou plastovou síťku a květináče jsem očísloval. Spodní polovinu jsem napěchoval 1 l neinokulovaného substrátu, horní polovinu 0,9 l adekvátně inokulovaným substrátem a to jsem ještě převrstvil cca 2-3cm vrstvou neinokulovaného substrátu. Do každého květináče se celkem vešlo zhruba 2 l substrátu.

V experimentu jsem použil semena *Medicago truncatula* kultivaru Jemalong 5 (J5; G. Duc, INRA Dijon, Francie). Semena jsem povrchově ošetřil 98% H_2SO_4 po dobu 15 minut a poté jsem kyselinu rychle vyředil vodovodní a následně také destilovanou vodou. Semena klíčila při pokojové teplotě na vlhkém filtračním papíru v plastových Petriho miskách. Do každého květináče jsem dne 17.12.2014 zasadil 2 sazeničky staré 10 dní a jednu sazeničku starou 2 dny. Každou, sterilní pinzetou vytvořenou sadební jamku jsem zainokuloval 300 μ l rhizobiálního inokula (tj. 900 μ l na květináč, viz níže). 106 květináčů jsem přemístil do skleníku na randomizované pozice. První týden rostliny rostly pod polovičním umělým osvětlením, poté v normálním světelném režimu. Květináče byly denně zalévány stejnou dávkou destilované vody podle potřeby a 22., 29., 36., 43., 50. a 57. den růstu pohnojeny 65 ml modifikovaného roztoku Long-Ashton (snížené množství fosfátu na 20 % originálního receptu; Hewitt a Smith, 1975).

Rhizobiální inokulum jsem napěstoval ze zmražené ($-80^\circ C$) kultury *S. meliloti* (kmen č. 10 izolován z litoměřické půdy, viz výše) v tryptonovo-kvasničném bujónu v plastových Erlenmeyerových baňkách s víčkem s filtrem. Všechny roztoky jsem připravil v destilované vodě a steriloval klávováním. K 75 ml roztoku A (3 % kvasničného extraktu, 2,5 % tryptonu a 2,5 % peptonu) jsem přidal 750 μ l roztoku B (1M $CaCl_2$) a 75 μ l bakteriálního inokula. Kultivace při $23^\circ C$ na orbitální třepačce trvala 6 dní. Výslednou bakteriální suspenzi jsem zcentrifugoval (2 min, 4100 RPM, $20^\circ C$), živné médium odlil, pelet zalil síranovým roztokem (0,5% $MgSO_4$), promíchal na vortexu a zcentrifugoval, opět odlil supernatant. Přečištěnou kulturu jsem ředil síranovým roztokem na požadovanou optickou hustotu ($OD_{(600\text{ nm})} = 0,74$; absorbance 0,77 odpovídá řádově hustotě $1,9 \cdot 10^9$ buněk / ml).

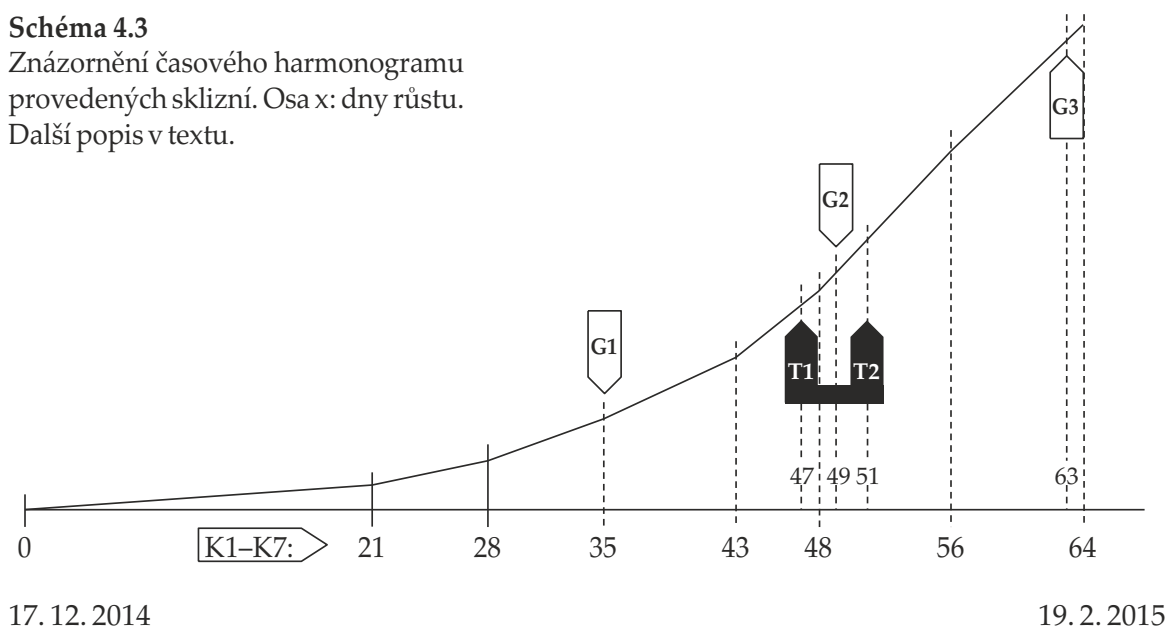
4.3. Sklizně rostlin

V daný čas byly vybrané květináče ze skleníku postupně odebírány a sklizeny za asistence kolegů. Byly provedeny tři typy sklizně, které jsou vyznačeny na schématu 4.3:

1) Sklizně K: Prýty jsem ustříhl, opláchnul od písku a osušil, zvážil (suchá hmotnost prýtů), zabalil do papírového psaníčka a vložil do sušárny, kde byly sušeny při $65^\circ C$ do sucha. Substrát jsem vyklepnul a kořeny oklepal, v latoru s vodou zbavil zbytků substrátu, nastříhal na menší kousky a promíchal, scedil přes síto, osušil a zvážil (čerstvá hmotnost kořenů). Do scintilační lahvičky jsem odebral trochu kořenů ke stanovení kolonizace (cca 1-2 g) a uskladnil při $3^\circ C$ v 50% etanolu (viz níže), zbytek jsem zabalil do papírového psaníčka a vložil do sušárny ($65^\circ C$). Suché kořeny a prýty jsem znovu zvážil (suchá hmotnost – u kořenů dopočítaná ztráta odebráním na stanovení kolonizace) a namlety v oscilačním mlýnu MM200. Z namleté sušiny jsem stanovoval koncentraci fosforu v materiálu (viz níže).

Schéma 4.3

Znázornění časového harmonogramu provedených sklizní. Osa x: dny růstu. Další popis v textu.



2) Skliziň T: Prýty a kořeny značené ^{13}C jsem odebral stejným způsobem jako v bodě 1, ale nebyly odebrány kořeny na stanovení kolonizace. Suché kořeny a prýty jsem znovu zvážil a namlel v kulovém mlýně. Z namleté sušiny jsem odebíral navážky do hmotnostního spektrometru (viz níže).

3) Skliziň G: Prýty a kořeny, ze kterých byla získána RNA (viz níže), byly sklizeny mezi 10. a 12. hodinou (G1 10:20-11:20; G2 10:10-11:40; G3 10:50-11:55) co nejrychleji: prýt jsem odstříhl, bleskově opláchnul, vložil do alobalového psaníčka a zamrazil v tekutém dusíku. Substrát jsem vyklepl a kořeny oklepal, pod tekoucí ledovou vodou jsem je zbavil zbytků substrátu, bleskově osušil, zbavil hypokotylů a spodních 5-7 cm, vložil do alobalového psaníčka a zamrazil v tekutém dusíku. Vzorky jsem nadrtl nejmenno v keramické třecí misce s tloučkem za přítomnosti tekutého dusíku a uskladnil při -80°C .

Další (vedlejší) případ sklizení materiálu obdobný bodu 1 je ustříhnutí jednoho ze tří prýtů v později (po 12 dnech) ^{13}C -značených květináčích. Vybral jsem ten nejmenší prýt (od oka), zvážil ho, usušil (65°C), opět zvážil a namlel na kulovém mlýnu. Z namleté sušiny jsem odebral navážky pro stanovení pozadí ^{13}C před značením, navíc víko systému pro zachytávání podzemní respirace (viz níže) umožňovalo instalaci pouze 2 rostlin, respektive všech v jedné přímce.

4.4. Laboratorní metody

4.4.1. Barvení kořenů Trypanovou modří:

Metoda je modifikací Koske a Gemma, 1989. Kořeny jsem odsátím zbavil etanolu, zalil je 10% KOH a nechal je louhovat 45 min při pokojové teplotě, poté jsem je zahříval 30 min ve vodní lázni (80°C). Po třikrát opakovaném promytí vodovodní vodou jsem je zalil 1% HCl a louhoval 30 min (pokojová teplota), poté zahřál 15 min v horké lázni (80°C). Po dvojitým promytí vodou jsem je zalil 0,05% trypanovou modří v laktoglycerolu a nechal jsem kořeny barvit 35 min v horké lázni (80°C). Barvivo jsem odsál, kořeny dvakrát promyl vodou, zalil laktoglycerolem (voda : kyselina mléčná : glycerol v poměru 1 : 1 : 1) a uskladnil v chladničce (4°C). Obarvené kořeny jsem pinze-

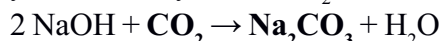
tou nakladl na mikroskopické sklíčko a mikroskopicky jsem stanovil míru kolonizace (Giovannetti a Mosse, 1980).

4.4.2. Stanovení koncentrace fosforu Malachitovou metodou:

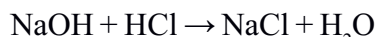
Do keramického kelímku jsem odvážil 0,08 – 0,1 g namleté sušiny, kelímek jsem zavíčkoval alobalem, do kterého jsem udělal několik dírek, a pražil v peci při 550°C přes noc. Výsledný popel jsem několik sekund povařil s 1 ml 69% HNO₃ a doplnil ultračistou vodou na 50 ml. Do 4ml kyvet jsem odměřil 2 ml ředěného roztoku vzorku, 0,4 ml roztoku MI a po 10 minutách 0,4 ml roztoku MII (podle Ohno a Zibilske, 1991). Mícháno přes noc na překlopné třepačce. Poté jsem změřil absorbanci při vlnové délce 610 nm a vypočítal koncentraci P v biomase. Desetibodový referenční žebříček známých koncentrací (ředící řada) fosforu jsem připravil z ultračisté vody a roztoku fosforu (1 mg P / l) ve stejné sérii se vzorky. Pro 11 vzorků bylo měření zopakováno, jelikož jejich koncentrace vybočovala z referenční řady.

4.4.3. Značení rostlin 13C a podzemní respirace:

Metoda je podrobněji popsána v Slavíková a kol., 2017. V 7:30 bylo 28 květináčů přesunuto pod značící plexisklovou komoru, tu jsem utěsnil a v 7:40 zapnul světla. Koncentraci CO₂ a intenzitu osvětlení uvnitř komory jsem po celou dobu snímal. V 8:46 započalo značení: do skleněné misky s 5g NaHCO₃ (99% C₁₃, Cambridge Isotope Laboratories) uvnitř komory jsem vstříkl 80 ml 20% H₃PO₄, čímž se uvolnil CO₂ do komory. V 10:45 bylo značení ukončeno: víko jsem odklopil, polovinu květináčů sklídl ihned (tj. 14 květináčů po 119 minutách) a druhou polovinu po 4 dnech. Tuto druhou polovinu jsem vložil do válců napojených na laboratorní promývačky s 200 ml destilované vody + 10 ml 1M NaOH napojených na vzduchový motorek. Květináč jsem uzavřel víkem se štěrbinou na prýty, kterou jsem utěsnil silikonovou hmotou. Po 2,5 hodiny (11:30 - 14:00) byl vzduch z podzemních prostor jímán do roztoku, který nebyl analyzován, a od 14:10 jsem započal jímání CO₂, které jsem dále zanalyzoval. Zachytávání CO₂ v roztoku popisuje rovnice:

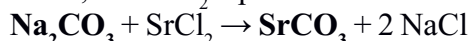


Vzorky jsem obarvil pH indikátorem (dvě kapky fenolftaleínu) a titroval 1M HCl. Ta reaguje se zbylým NaOH v roztoku podle rovnice:

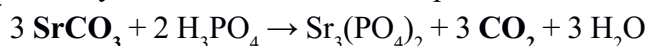


Ze spotřebované HCl jsem vypočetl zreagované množství NaOH s CO₂ jako rozdíl původního objemu NaOH (10 ml) a titrovaného HCl ($c_{(\text{HCl})} = c_{(\text{NaOH})}$). Toto vypočtené látkové množství odpovídá dvojnásobku látkového množství zachyceného CO₂.

Do roztoku jsem dále přidal 5 ml 1,2M SrCl₂ a přes den ho nechal srážet podle rovnice:



Roztok jsem dekantoval, suspenzi přelil do 50ml zkumavek a stočil na centrifuze (2 min, 2000 ot./min). Supernatant jsem odlil, pelet promyl cca 20 ml destilované vody, protřepal, opět zcentrifugoval, slil jsem supernatant, přidal 1 ml dH₂O. Suspenzi jsem přepipetoval do 1,5ml zkumavky Eppendorf, opět zcentrifugoval, slil supernatant a pelet jsem dal sušit s pootevřenými víčky do sušárny při 65°C přes víkend. Takto promytý uhličitán strontnatý jsem navažoval do 12ml zkumavek s gumovým víčkem (Vacutainer®), skrz které jsem injekční stříkačkou vpravil malé množství kyseliny a uvolněné CO₂ se analyzovalo na hmotnostním spektrometru.



4.4.4. Izolace RNA

Při izolaci RNA byly používány pro práci s RNA vyhrazené rukavice, zkumavky, špičky, chemikálie a jiný spotřební materiál, aby se zamezilo kontaminaci jinou činností v laboratoři. Chemikálie a zařízení (např. rotory centrifugy) byly před použitím vychlazeny na nejnižší teplotu, typicky na ledu (0°C), pokud není uvedeno jinak. Chemikálie byly připravovány v DEPC-ošetřené vodě (0,1% diethyl pyrokarbonát) či vodě bez ribonukleáz (RNáz) a pokud možno, tak ještě sterilovány klávováním.

Hluboce zmražený vzorek kořenové nebo prýtové biomasy v 50ml zkumavce (Falcon) jsem smíchal s 8 inertními kuličkami (ZrO_2) a na 80°C zahřátou, dokonale promíchanou směsí 4 ml fenolu a 4 ml extrakčního pufru (pH 6,0; na 100 ml DEPC-ošetřené vody: 1,95 g 100mM Tris, 0,424 g 100mM LiCl, 0,372 g 10mM EDTA, 1 g 1% SDS; sterilováno autoklávováním) a intenzivně promíchal na vortexovém mixéru (vortexu). Poté byl vzorek 20 s ve vodní lázni (80°C), po zahřátí jsem ho míchal 40 s na vortexu. Přidal jsem 4 ml chloroformu a opět vzorek promíchal na vortexu. Směs byla stočena (20 min, 0°C, 5000 rpm) na centrifuze Sigma sartorius (zcentrifugována), čímž se vytvořila ve spod chloroformová fáze, uprostřed pelet biomasy a na vrchu supernatant extrakčního pufru. Supernatant jsem odsál do nové zkumavky, přidal jsem 4 ml chloroformu, směs promíchal na vortexu a opět zcentrifugoval. Ošetření chloroformem jsem opakoval celkem čtyřikrát, dokud nezmizela nerozpustná peleta, a 2 ml co nejčistšího supernatantu jsem přepipetoval po 0,5 ml do čtyř 1,5ml zkumavek (Eppendorf). Extrakt jsem opět zcentrifugoval v odpovídajícím rotoru (5 min, 0°C, 15 000 rpm) a supernatant smíchal s 8M LiCl v objemovém poměru extrakt : 8M LiCl 2 : 1, tj. na 2 ml extraktu připadlo 0,68 ml 8M LiCl. Vzorky jsem nechal vysrážet přes noc na ledu.

Přes noc vysrážené vzorky jsem zcentrifugoval (20 min, 0°C, 15 000 rpm) a supernatant jsem slil. Peletu jsem resuspendoval v 0,5 ml 75% etanolu a sdružil jsem vzorky do 2 replikátů (2 x 1 ml suspenze). Po dalším zcentrifugování (20 min, 0°C, 15 000 rpm) jsem odstranil supernatant a každou peletu (2 pelety na vzorek) jsem rozpustil v 250 μl H_2O bez RNáz, přidal jsem 500 μl 96% etanolu a 25 μl 3M acetátu sodného. Po promíchání otáčením v ruce jsem směs dal vysrážet na led (0°C) po dobu 1 hodiny, následně zcentrifugoval (20 min, 0°C, 15 000 rpm) a odstranil jsem supernatant. Pelety jsem rozpustil v H_2O bez RNáz a spojil je do 1 vzorku o celkovém objemu 100 μl . Výslednou celkovou RNA jsem rozpipetoval do alikvotů po 70 μl a třikrát 10 μl , přičemž jeden 10 μl alikvot jsem použil pro měření koncentrace RNA na nanodropu a zbylé alikvoty jsem ihned zamrazil v tekutém dusíku a uskladnil při -80°C.

4.4.5.Ověření koncentrace RNA na nanodropu

1 μl celkové RNA bylo použito k měření na nanodropu. Mezi jednotlivými měřeními jsem čidlo omyl destilovanou vodou. Jako pozadí byla použita voda bez RNáz, kterou jsem použil pro rozpuštění RNA v posledním kroku její izolace. Koncentrace surové, celkové RNA v roztoku se pohybovala od 818,5 do 4108,5 ng / μl .

4.4.6.Ošetření deoxyribonukleázou (DNázou) a příprava pro RT-PCR

K ošetření byl použit *DNA-free™ DNA Removal Kit* (Ambion) podle pokynů výrobce: Ke 30 μg celkové RNA (v 50 μl vody) jsem přidal 5 μl 10x DNase I Buffer a 1 μl rDNase I. Směs jsem nechal hřát 30 min při 37°C. Poté jsem reakci ukončil 5 μl DNase Inactivation Reagent při laboratorní teplotě po 2 min. Vzorek jsem zcentrifugoval (2 min, 0°C, 11 640 rpm) a odebral jsem 35 μl výsledné, DNA zbavené RNA (supernatantu). 5 μl alikvot jsem použil pro měření na nanodropu, 20 μl jsem zamrazil v tekutém dusíku a uskladnil (-80°C) a 10 μl jsem uchoval na ledu (0°C) a tentýž den je použil jako substrát do RT-PCR. Koncentrace této RNA se pohybovala od 312,6 do 850,6 ng / μl .

4.4.7.RT-PCR: Tvorba cDNA reverzní transkripcí

K vytvoření komplementárního vlákna DNA byl použit *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* (Roche) podle pokynů výrobce s výjimkou použití kombinace obou typů PCR primerů: 4 μg celkové, DNA zbavené RNA (ve třetině případů bylo RNA méně (minimálně ale 2,62 μg) kvůli nízké koncentraci a maximálnímu objemu v reakci – koncentrace RNA stanovená výrobcem je v rozmezí 1 ng – 4 μg), tj. 8,4 μl RNA jsem smíchal s 3 μl PCR primerů (2 μl Random Hexamer Primer (600 pmol/ μl) + 1 μl Anchored-oligo[dT]₁₈ Primer (50 pmol/ μl)) a zahříval při 65°C po 10 min. Poté jsem reakci zchladil na ledu (0°C). Přidal jsem 8,6 μl „master mixu“ (4 μl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5x koncentrovaný; 0,5 μl Protector RNase

Inhibitor, 40 U/μl; 2 μl Deoxynucleotide Mix, 10 mM každý; 1 μl DTT; 1,1 μl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase, výsledná koncentrace 22 U) a takto připravených 20 μl reakční směsi nechal projít jedním cyklem v cykléru: 10 min, 29°C; 60 min, 48°C; 5 min, 85°C; 0°C. Výslednou cDNA jsem uchovával zamraženou při -20°C.

4.4.8.Ověření kolonizace pomocí qRT-PCR

Připravenou cDNA jsem použil v kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR) s použitím primerů specifických pro *R. irregularis* mitochondriální oblast velké ribozomální podjednotky (mt5 intra, Couillerot a kol., 2013). Použil jsem pozitivní i negativní kontrolu. Reakční směs byla následující: 13,1 μl H₂O, 0,4 μl primeru F, 0,4 μl primeru R, 0,1 TaqMan® próby (Thermo Fisher Scientific), 4 μl SBD, 2 μl templátu (cDNA). Po prvotním zahřátí na 95°C (15 min) proběhlo 50 cyklů: 95°C, 10 s; 54°C, 1 min; 72°C, 10 s. Porovnáním C_T hodnot byla potvrzena kolonizace mykorhizních rostlin a nekontaminovanost rostlin nemyorhizních.

4.4.9.Kontrola kvality RNA a analýza na DNA čipu (microarray)

Na analýzu pomocí DNA čipu byly vybrány pouze 3 mykorhizní vzorky a 3 nemyorhizní vzorky z první sklizně, tj. bylo použito celkem 12 čipů (6 kořenových a 6 prýtových). Tuto metodu provedla Servisní laboratoř funkční genomiky a bioinformatiky Ústavu molekulární biologie AV ČR, v.v.i. Ke kontrole kvality celkové RNA (neošetřené DNázou) použili systém *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies). Kvalita RNA byla vyhodnocena jako dobrá a vzorky byly postoupeny k analýze na GeneChip® Medicago Transcriptome Assay (Affymetrix).

4.4.10.qRT-PCR: Kvantitativní PCR v reálném čase

Připravenou cDNA jsem použil v kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) s použitím EvaGreen® mastermixu (Solis BioDyne, Tartu, Estonsko). Reakční směs byla následující: 13,1 μl H₂O, 0,4 μl primeru F, 0,4 μl primeru R, 4 μl EvaGreen mastermixu, 2 μl templátu (cDNA). Po prvotním zahřátí na 95°C po 15 min proběhlo 50 cyklů: 95°C, 10 s; x°C, 1 min; 72°C, 10 s; kdy „x“ odpovídá zkalibrovaným teplotám nasednutí primerů (52-60°C dle genu, viz tabulka). Z výsledných C_T hodnot jsem vypočetl počet transkriptů na μl.

4.4.11. Příprava amplikonů a kalibrace

DNA z proběhlé qPCR jsem očištil pomocí *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) dle instrukcí výrobce a její koncentraci změřil pomocí *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit* (ThermoFisher Scientific) dle instrukcí výrobce. Z naměřené koncentrace a molekulové hmotnosti amplifikovaných fragmentů jsem spočetl počet kopií amplikonů / μl. Tyto přečištěné amplikony jsem dále skladoval při -20°C a přidával je v 10 ředěních do stejné qPCR jako měřené vzorky. Z C_T hodnot amplikonů jsem vytvořil kalibrační křivky a díky nim jsem spočetl počet transkriptů v každém vzorku.

4.5. Metody in silico

4.5.1.Design specifických primerů pro vybrané geny

Specifické primery jsem nadesignoval v programu AlleleID 6.0 (Premier Biosoft, USA). Použil jsem stejnou cílovou sekvenci vybraných genů jako je cílová sekvence použitá společností Affymetrix pro jejich próby v GeneChip® Medicago Transcriptome Assay. Ze 3 možných dvojic primerů byla vybrána 1 dvojice, jejíž odhadovaná teplota tání souhlasila s celkovým souborem 11 designovaných primerů. Specifičnost primerů jsem ověřil porovnáním s celou databází NCBI pomocí programu BLAST. Konečné sekvence (viz tabulka 4.5.1.) byly předány k chemické syntéze primerů (Generi Biotech, Česká Republika).

Tabulka 4.5.1.: Přehled primerů				
Genový symbol	Anotace genu	Zkratka	Sekvence primerů	TaOpt [°C]
MTR_1g028460	bidirectional sugar transporter (MtSWEET3c)	ST1F	ATGCTTCTCCTTTGGTTGTTATG	50
		ST1R	AGCCACAATACACTAGCCAAG	
MTR_1g104780	sugar porter (Mtst1)	ST2F	TCCTCTTCACTGCTGTCATTG	52
		ST2R	CTTTGTGTCATCTCTTCAATAGGG	
MTR_2g025590	transcription initiation factor IIF subunit alpha	ST_refF	AAACAGGACGATGAGGAGGAGGAG	55
		ST_refR	ACCACCAGTTCGCCCCAAGC	
MTR_3g089125	bidirectional sugar transporter (MtSWEET1b)	ST3F	CTTTGCCCTATTACCTTGG	54
		ST3R	AACAGCGACAAGAAGAATGG	
MTR_3g116060	tonoplast monosaccharide transporter 2 (TMT)	ST4F	CTGGATTGGAGACATCATTG	52
		ST4R	CCTTCAGATACACAAATACCC	
MTR_4g131800	glucose-6-P/P translocator (MtGPT1)	ST5F	ATATTGACATAGCAGGAGACAAG	51
		ST5R	ACCAGCAGCAAGGGACAAAG	
MTR_5g019870	polyol/monosaccharide transporter (PMT)	ST6F	TTCTATTATTGGTCAGTTCAGGAG	51
		ST6R	TGTGCTCTCAACCTTAGTGG	
MTR_5g026640	sodium:solute symporter	ST7F	GTTAGCAGTTATACTAAACAAAGC	51
		ST7R	TGATTATTCCAAGAACAACACC	
MTR_6g081060	nucleotide-diphospho-sugar transferase	ST8F	ATTGGATCATCTTGTGGTAATAAC	51
		ST8R	CTATATCCCAAATGAAGAACAGC	
MTR_8g071050	putative transmembrane protein	ST9F	CAGTGGCTTAATTTGGTTAGTTG	51
		ST9R	ACATTGTGGTAAATGATGAGAGG	
MTR_8g077890	polyol/monosaccharide transporter (PMT)	ST10F	ACTTGACAACTTGGTAGAAGAC	53
		ST10R	AGTTGCGACGATGCTAAGG	
MTR_6g021800	GTP-binding elongation factor Tu family protein	MtEF1a F	AGAAGGAAGCTGCTGAGATGAAC	63
		MtEF1a R	TGACTGTGCAGTAGTACTTGGTG	

4.5.2. Analýza genové exprese v prostředí Genevestigator®

Transkriptomická data z mikroarray DNA čipů byla nahrána do prostředí *Genevestigator*® 4-36-0 (Nebion) (Hruz a kol., 2008). K hledání několika genů vhodných k dalšímu zkoumání jsem použil tyto aplikace: k prvotnímu zorientování se aplikace Co-Expression a Dif-Expression zobrazující geny na podobné expresní hladině jako gen vybraný, respektive geny s výrazně odlišnými hladinami exprese mezi dvěma skupinami vzorků (mykorhizní a nemykorhizní); pro vybrání referenčního genu aplikace Ref-Genes (Hruz a kol., 2011), která mi nabídla několik genů se stabilní expresí napříč vybranými (mými) vzorky; a nejvíce jsem používal aplikaci Samples pro hledání dle klíčových slov nebo hledání konkrétních genů. Jelikož na první pohled nejlepší aplikace Co-/Dif-Expression zobrazovaly příliš velké množství výsledků z různých oblastí genové ontologie, získal jsem výsledky pouze využitím aplikace Samples. I tak jsem získal sady výsledků o relativně velkém počtu odpovídajících genů (prób), ale sdružovaly geny související funkce a mohl jsem je zpracovat ručně. Tento postup byl výhodný i z toho důvodu, že z hypotézy vyplývá jasný cíl – cukerný transportér. Pro vyhledání možných genů zájmu jsem využil těchto klíčových slov: „sugar“, „transmembrane“, „transporter“, „saccharide“, „monosaccharide“, „sucrose“, „sucrose synthase“, „symporter“, „antiporter“, „alpha beta“, „glucosidase“, „glucose“, „glycan“, „fructose“, „fructan“, „trehalose“, „sorbitol“, „mannitol“, „mannose“, „mannan“, „ascorbate“, „cellulose“, „sweet“, „invertase“, „sucrase“. Také jsem využil souhrnného článku o monosacharidových transportérech (Wipf a kol., 2012 – tabulka S1), jejichž seznam byl celý prověřen. Z větších souborů zobrazených

průběh (expresních profilů) jsem výběr zužoval, dokud nevznikla konečná skupina 10 genů + 1 genu referenčního, které vykazovaly zajímavé expresní vzory – typicky projevovaly zvýšenou nebo systematicky sníženou expresi v mykorhizních kořenech (viz výsledky).

Databáze transkriptomických dat společnosti Genevestigator mi nabídla v době analýzy pouhé 3 další (veřejné) mykorhizní experimenty na *M. truncatula*, respektive i jeden nemyorhizní, na koncentraci fosfátů v hnojivu zaměřený experiment (Hogekamp a kol., 2011; Ortu a kol., 2012; Truong a kol., 2014; Truong a kol., 2015). Tato data jsem použil k ověření získaných výsledků alespoň v hrubém měřítku.

4.5.3. Anotace vybraných genů

10 vybraných genů bylo potřeba blíže přiblížit, rozkrýt jejich obecné pojmenování. Základním nástrojem je srovnávací algoritmus BLAST, který porovnává primární sekvence genů či proteinů s celosvětovou databází. Využil jsem program dostupný online (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) od společnosti National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (NCBI), použité databáze byly „nucleotide collection (nr/nt)“, respektive „non-redundant protein sequences (nr)“, v základu nastavené parametry hledání jsem neupravoval s výjimkou zúžení databáze definováním organismů na suchozemské rostliny („land plants (taxid:3193)“, čeleď bobovitých („Fabaceae (taxid:3803)“) a jiné, či přímo rod tolíce („Medicago (taxid:3877)“).

Další použitou metodou – bohužel neúspěšně – bylo hledání význačných eukaryotních motivů (ELM – <http://elm.eu.org/> – Puntervoll a kol., 2003). Program ukazuje motivy i na místech, které nejsou přístupné tak, aby plnily navrženou funkci (typicky je motiv uprostřed transmembránového helixu) a motivů je nalezeno velké množství, proto jsem tuto analýzu ve výsledku nevyužil.

Naopak úspěšně použitou metodou pro poodhalení funkce neznámých, neanotovaných proteinů („putative / predicted transmembrane protein“) byla analýza membránového charakteru proteinů za pomoci softwaru HMMTOP 2.0 (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>), automatického serveru pro predikci transmembránových helixů a topologie proteinu (Tusnady a Simon, 1998), poté také nad-

Tabulka 4.5.3.: Přehled vybraných genů				
Zkratka	Genový symbol	Anotace genu		Klasifikace
ST1	MTR_1g028460	bidirectional sugar transporter	SWEET3c	TC 2.A.123
ST2	MTR_1g104780	sugar porter (SP) family MFS transporter	Mtst1	TC 2.A.1.1.x
ST3	MTR_3g089125	bidirectional sugar transporter	SWEET1b	TC 2.A.123
ST4	MTR_3g116060	tonoplast monosaccharide transporter	TMT	TC 2.A.1.1.x
ST5	MTR_4g131800	glucose 6-phosphate/phosphate translocator 1	GPT1	TC 2.A.7.9.6
ST6	MTR_5g019870	polyol/monosaccharide transporter	PMT	TC 2.A.1.1.x
ST7	MTR_5g026640	sodium:solute symporter family protein	DUR3-like	TC 2.A.21.6.2
ST8	MTR_6g081060	nucleotide-diphospho-sugar transferase family protein	NDP-ST	EC 2.4.1.x
ST9	MTR_8g071050	transmembrane protein, putative	?	TC 2.A.1.x
ST10	MTR_8g077890	polyol/monosaccharide transporter	PMT	TC 2.A.1.1.x
ref1	MTR_2g025590	transcription initiation factor IIF subunit alpha	TIF2a	-
ref2	MTR_6g021800	GTP-binding elongation factor Tu family protein	TEF1	-
PT1	MTR_1g043290	high affinity inorganic phosphate transporter	PT1	TC 2.A.1.9.3
PT2	MTR_1g043220	high affinity inorganic phosphate transporter	PT2	TC 2.A.1.9.3
PT3	MTR_1g043200	high affinity inorganic phosphate transporter	PT3	TC 2.A.1.9.3
PT4	MTR_1g028600	high affinity inorganic phosphate transporter	PT4	TC 2.A.1.9.3
PT5	MTR_1g074930	high affinity inorganic phosphate transporter	PT5	TC 2.A.1.9.6
PT6	MTR_3g082700	high affinity inorganic phosphate transporter	PT6	TC 2.A.1.9.x

stavbovou platformou CCTOP (<http://cctop.enzim.ttk.mta.hu>) (Dobson a kol., 2015). Takto analyzované a zároveň zajímavé geny jsem ověřil i druhou, obdobnou platformou PredictProtein (<http://predictprotein.org/> - Yachdav a kol., 2014), která vykázala stejný výsledek.

4.5.4. Statistické analýzy v prostředí RStudio

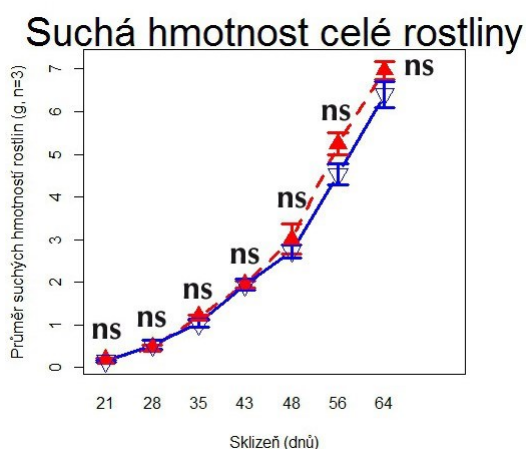
Expresní hodnoty transkriptů z qRT-PCR jsem podrobil statistickým analýzám za použití programovacího jazyka R 3.0.0 v prostředí *RStudio* 0.99.902 (RStudio). Využil jsem funkcí „t.test“ pro párový t-test středních hodnot porovnávaných dat, funkce „lm“ a „anova“ pro vytvoření lineárního modelu a analýzu rozptylu, a „lineplot.CI“ z balíčku „sciplot“ pro grafické zobrazení výsledků se středními hodnotami rozptylu.

5. Výsledky

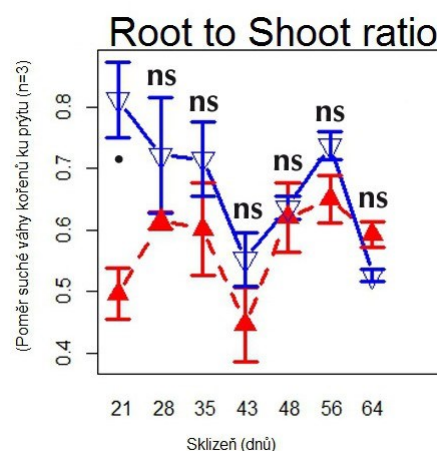
Rozsah získaných výsledků kopíruje tři typy sklizní, respektive tři typy dat, které ze sklizní vznikly. Jsou to růstové parametry rostlin (počet opakování, tj. $n = 3$), transkripční hodnoty vybraných genů ($n = 5$) a data toku stabilního izotopu ^{13}C ($n = 7$) – vše porovnáváno mezi dvěma variantami rostlin kolonizovaných mykorhizní houbou (**M+**; znázorněno **červeně**) a nekolonizovaných (**NM**; znázorněno **modře**). Všechny tyto rostliny byly pěstovány ve stejný čas za stejných podmínek a rozmístěny na náhodných pozicích vzájemně promíchány (viz metodika), tudíž je možné různé výsledky srovnávat mezi sebou a v diskuzi pak vyvozovat společné závěry.

5.1. Suchá hmotnost biomasy M+ a NM rostlin je srovnatelná

Rostliny jsem sklídl po 21, 28, 35, 43, 48, 56 a 64 dnech růstu. Nadzemní a podzemní biomasu jsem usušil a zvážil. Statistickým porovnáním variant t-testem v jednotlivých časových bodech jsem neprokázal významnou odlišnost souborů dat (M+ a NM) v jednotlivých časových bodech, tudíž je suchá hmotnost biomas celkových (viz graf 5-1-1), kořenových i prýtových srovnatelná u M+ i NM rostlin. Jedinou významnou odlišnost mezi biomasami M+ a NM rostlin jsem prokázal u poměrů suché hmotnosti kořenů ku prýtu, ale pouze v prvním časovém bodě, tj. po 21 dnech růstu (viz graf 5-1-2).



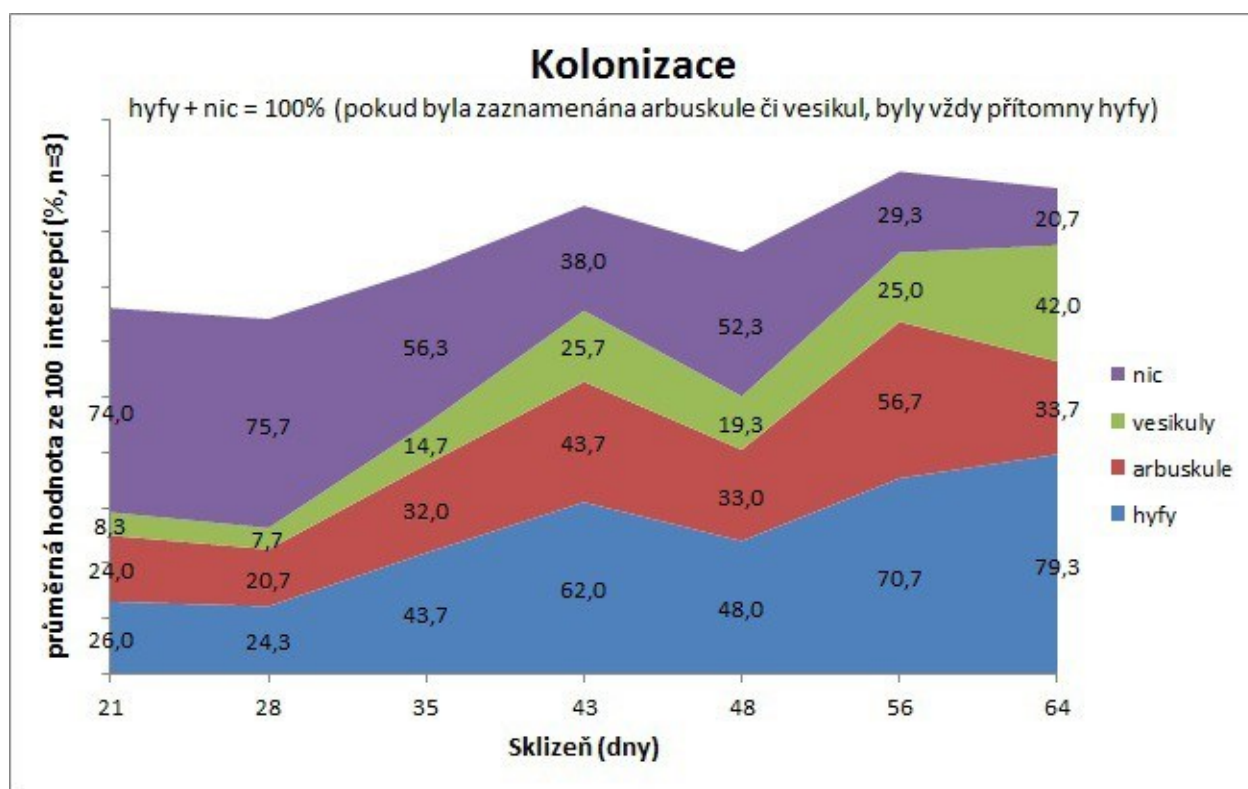
Graf 5-1-1



graf 5-1-2

5.2. M+ rostliny byly kolonizované, NM nikoliv

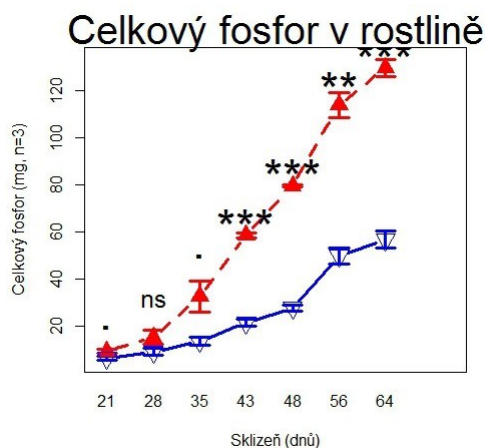
Kolonizaci rostlin arbuskulárně-mycorhizní houbou *G. intraradices* jsem prokázal či vyvrátil dvěma způsoby – mikroskopicky (viz metodika) a pomocí qPCR (viz metodika) – v 7 časových bodech (po 21, 28, 35, 43, 48, 56 a 64 dnech růstu). Mikroskopické vyhodnocení obarvených kořenových vzorků průsečíkovou metodou potvrdilo čistotu NM rostlin a odhalilo úspěšnou kolonizaci M+ rostlin, včetně časově-vývojového trendu této kolonizace, respektive houbových struktur v kořeni (viz graf 5-2-1), kdy se stářím rostlin narůstal počet arbuskulí i vesikulů. Tato data jsem také potvrdil za pomoci qPCR se specifickými houbovými primery (data neuvedena).



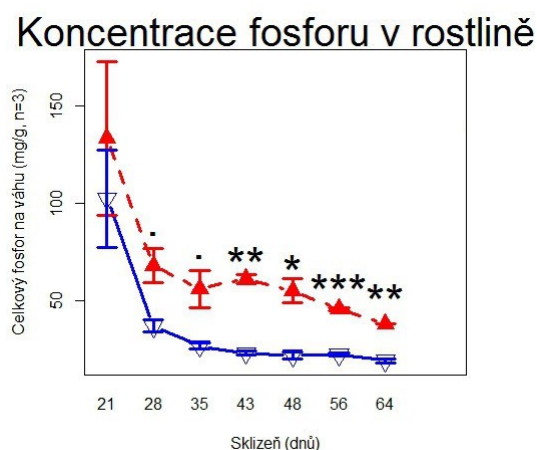
Graf 5-2-1

5.3. Celkový obsah i koncentrace fosforu je v M+ rostlinách dvojnásobný

U rostlin sklizených po 21, 28, 35, 43, 48, 56 a 64 dnech růstu jsem analyzoval jejich obsah fosforu v biomase malachitovou metodou (viz metodika). Data prokázala významné obohacení M+ rostlin fosforem – mnohdy dvojnásobné i větší! Celkový obsah fosforu byl průkazný ve všech bodech kromě bodu druhého (po 28 dnech růstu) a zejména od 43. dne byl rozdíl velmi významně rozdílný (viz graf 5-3-1). Obdobný trend statistické rozdílnosti M+ a NM rostlin jsem odhalil i u koncentrace fosforu v biomase (viz graf 5-3-2).



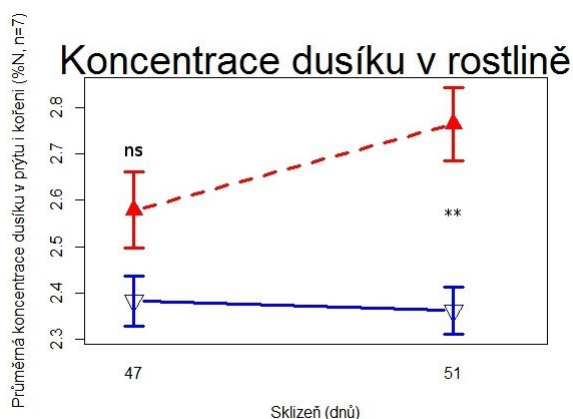
Graf 5-3-1



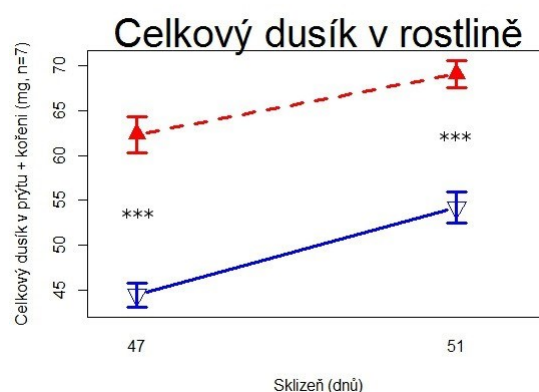
graf 5-3-2

5.4. Celkový obsah i koncentrace dusíku je v M+ rostlinách vyšší

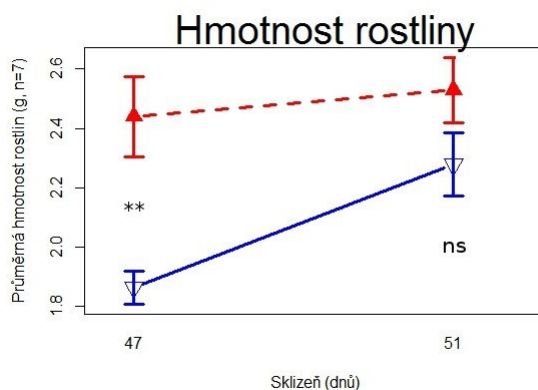
U rostlin sklizených po 47 a 51 dnech růstu jsem analyzoval jejich obsahu dusíku v biomase pomocí hmotnostní spektrometrie (viz metodika). Data prokázala významné obohacení M+ rostlin dusíkem zejména po 51 dnech růstu. Průkazné rozdíly v koncentraci dusíku (viz graf 5-4-1) a hlavně v celkovém obsahu dusíku (viz graf 5-4-2) jsou však hodnověrné pouze v druhém časovém bodě (po 51 dnech růstu), jelikož v bodě prvním byly tyto M+ rostliny průkazně větší (vzhledem k suché biomase; viz graf 5-4-3).



Graf 5-4-1



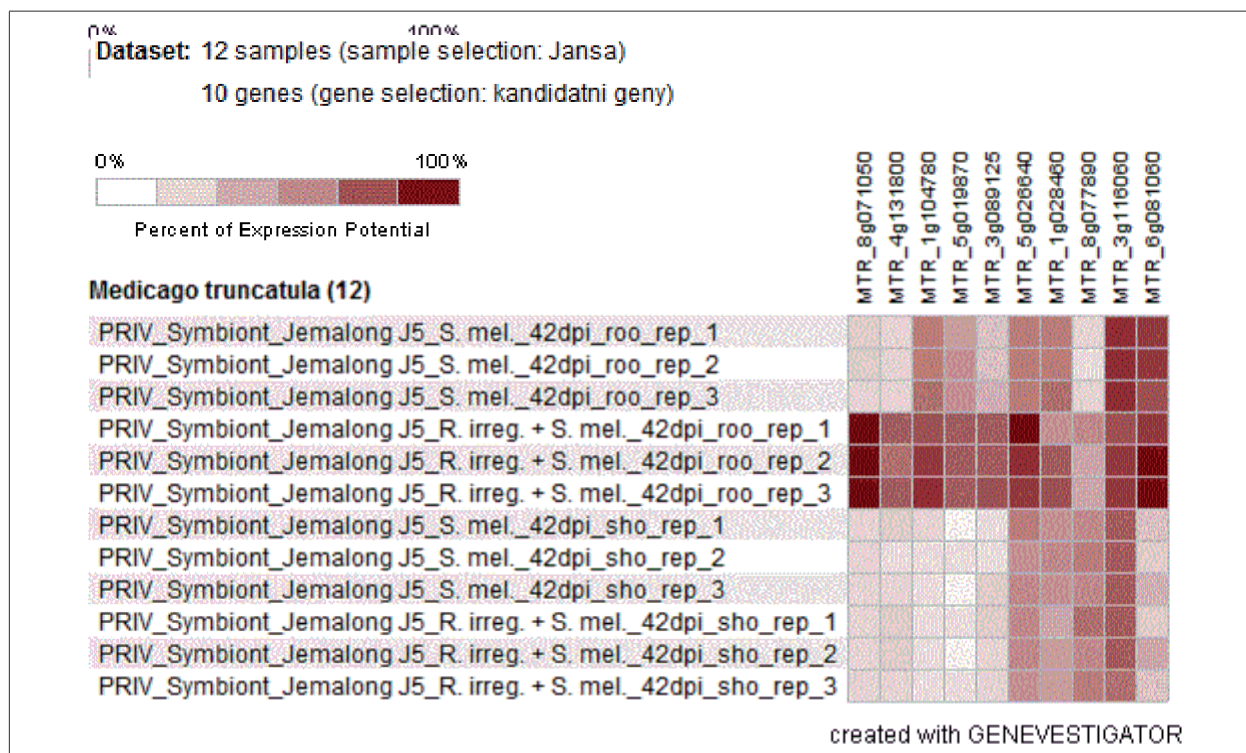
graf 5-4-2



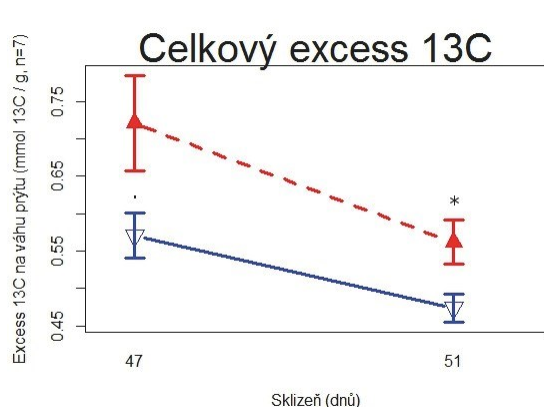
Graf 5-4-3

5.5. M+ rostliny nafixovaly více ^{13}C než NM rostliny

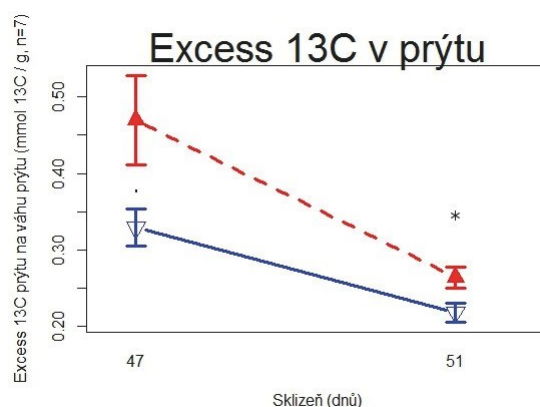
28 květináčů s rostlinami jsem vystavil atmosféře obohacené o $^{13}\text{CO}_2$, 47. den růstu a sklídl je ve dvou časových bodech – ten den (po 47 dnech růstu) a o 4 dny později (po 51 dnech růstu). M+ rostliny v obou časových bodech vykazovaly vyšší hladiny ^{13}C na gram suché váhy v prýtových vzorcích (viz graf 5-5-2) i po přepočtení na excess celkový (viz graf 5-5-1), ale v kořenech (viz graf 5-5-3) či půdě (viz graf 5-5-4) nebyl rozdíl potvrzen.



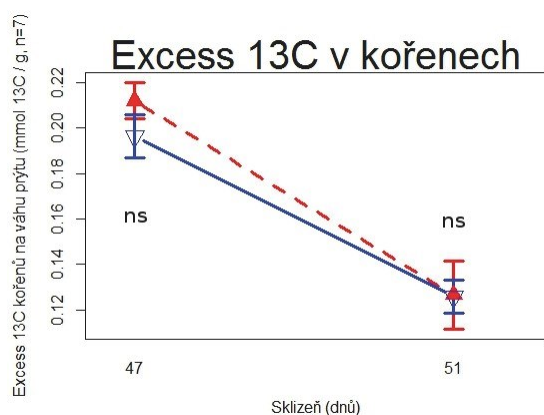
Obr. 5.7.: Expresní potenciál z mikročipů znázorněn v programu Genevestigator pro 10 vybraných genů.



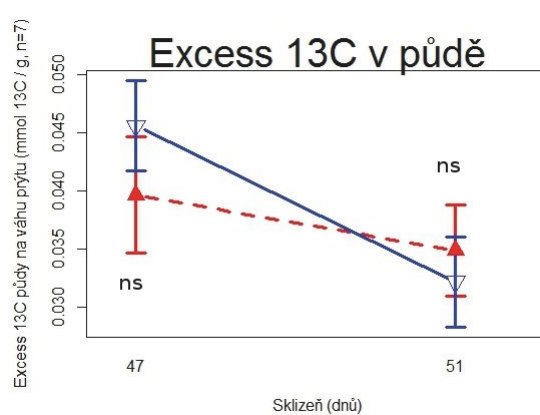
Graf 5-5-1



graf 5-5-2



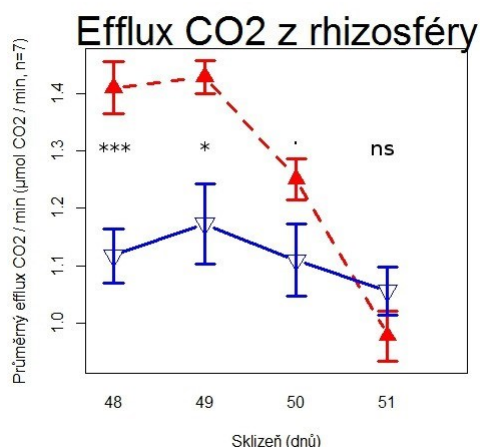
Graf 5-5-3



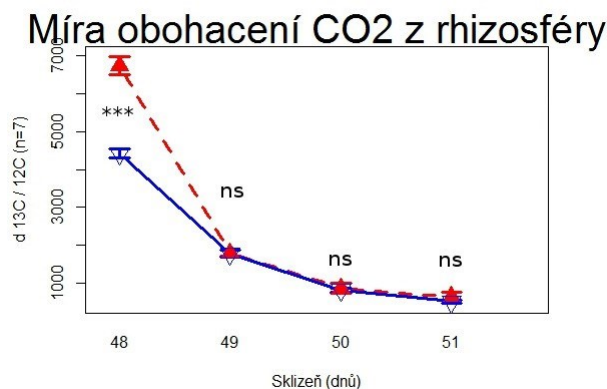
graf 5-5-4

5.6. M+ rostliny respirovaly více než NM rostliny

U rostlin značených ^{13}C a sklizených ve druhém časovém bodě (po 51 dnech růstu) jsem jímál podzemní respiraci každý den od značení (tj. po 48, 49, 50 a 51 dnech růstu) a vyhodnotil množství vydýchaného CO_2 (viz graf 5-6-1) i jeho obohacení o ^{13}C (viz graf 5-6-2). Květináče s M+ rostlinami uvolňovaly průkazně více CO_2 z podzemního kompartmentu (květináče s kořeny a mikroorganismy) než NM rostliny v prvních třech bodech (po 48, 49 a 50 dnech růstu), poté se rozdíl vyrovnal. V prvním časovém bodě (po 48 dnech růstu, tj. 1 den po značení) byl tento CO_2 průkazně obohacnější o ^{13}C u M+ variant, v dalších dnech se tento rozdíl vyrovnal úplně.



Graf 5-6-1



graf 5-6-2

5.7. Vybrané geny vykazují rozdílnou expresi během vývoje rostliny

Ze tří časových bodů (po 35, 49 a 63 dnech růstu) jsem izoloval RNA (viz metodika) a provedl její přepis do cDNA za použití dvou primerů: náhodných hexamerů a oligo-T (viz metodika). Z prvního časového bodu (35) jsem nechal analyzovat 3 kořenové a 3 prýtové M+ vzorky a 3 kořenové a 3 prýtové NM vzorky na mikročipu (viz metodika). Porovnáním transkriptomů M+ a NM rostlin jsem vybral *de novo* a prohledáním již publikovaných seznamů 10 genů účastnících se (pravděpodobně) cukerného transportu a zároveň vykazující rozdílnou hladinu exprese v M+ a NM rostlinách (viz tabulka 4.5.3 a obr. 5.7). Pro tyto geny a dva geny referenční jsem vytvořil specifické primery a společně s 6 fosfátovými transportéry jejich expresi ověřil ve všech třech časových bodech pomocí qRT-PCR. Tyto data jsem přepočítal na kopie té nukleové kyseliny (mRNA) na množství celkové RNA. Expres jednotlivých genů přehledně ukazují grafy PT1–6, Ref1, Ref2, ST1–ST10.

5.7.1. SWEET1b (ST3), GPT1 (ST5), ST9 a ST10 se zapínají v M+ kořenech

Expresní hodnoty těchto 4 genů byly velmi nízké (u ST3 a ST10) až téměř nulové (u ST5 a ST9) u kořenů NM rostlin ve všech 3 časových bodech. Naopak u M+ rostlin vykazují navýšenou expresi v kořenech, v porovnání s NM rostlinami lze říci, že byly dokonce zapnuty. SWEET1b (ST3) je průkazně upregulovaný ve všech 3 časových bodech. U zbylých 3 transportérů je v jednom časovém bodě rozdíl neprůkazný kvůli velkému rozptylu expresních hodnot, nicméně s přihlédnutím k téměř nulové expresi těchto genů u NM rostlin lze považovat GPT1 (ST5), domnělý membránový transportér (ST9) a polyol/monosacharidový transportér (ST10) taktéž za upregulované ve všech 3 časových bodech (viz grafy 5-5-3, 5-5-5, 5-5-9 a 5-5-10).

5.7.2.Na⁺/urea transporter (ST7) a NDP-sugar transferase (ST8) zvyšují expresi v M+ kořenech, v prýtu opačně

Dva geny vykazují podobný expresní profil v M+ kořenech: v prvním a třetím časovém bodě (po 35 a 63 dnech) je jejich exprese výrazně navýšena oproti NM kořenům, v druhém, prostředním časovém bodě (po 49 dnech) však jejich exprese padá na hladinu rovnocennou s NM kořeny (viz grafy 5-5-7 a 5-5-8). V NM kořenech je exprese těchto genů slabá, nicméně snadno detekovatelná.

Přestože je symportér Na⁺/močoviny (ST7) exprimován v prýtu slabě, mohl jsem prokázat potlačení jeho exprese v M+ prýtu (viz graf 5-5-18), což je protichůdný trend k expresi v kořenech. U NDP-cukr transferázy (ST8) jsem také naměřil nižší expresi v M+ prýtu, nicméně tyto hodnoty nejsou statisticky rozdílné (viz graf 5-5-19).

5.7.3.Expresa Mtst1 (ST2) a ST6 závisí na ontogenetickém vývoji rostlin

Tyto dva geny vykazují stejný trend změny vlastní exprese: v prvním časovém bodě (po 35 dnech) je prokazatelně vyšší exprese těchto genů v M+ kořenech, v druhém (po 49 dnech) padá exprese v M+ kořenech na hladinu NM kořenů a rozdílnost se smazává, ve třetím (po 63 dnech) však dochází naopak k silné upregulaci v NM kořenech (viz grafy 5-5-2 a 5-5-6).

5.7.4.TMT (ST4) a TIF2alfa (ref1) jsou v M+ kořenech potlačeny, v prýtu obdobně kromě prvního bodu

Tonoplastový monosacharidový přenašeč (ST4) i první referenční gen (transkripční iniciační faktor 2 alfa = TIF2a; ref1) jsou průkazně méně exprimovány v M+ kořenech ve druhém a třetím časovém bodě (po 49 a 63 dnech), v prvním je exprese podobná v M+ i NM kořenech (viz graf 5-5-4 a 5-5-11).

V prýtu vychází situace opět shodně pro oba geny: ve třetím časovém bodu (po 63 dnech) jsou geny v M+ prýtech výrazně potlačeny, ve druhém bodě (po 49 dnech) je exprese podobná pro M+ i NM prýt, nicméně pro TMT (ST4) vyšel rozdíl opět signifikantně ve prospěch NM rostlin. V bodě prvním (po 35 dnech) je však nepatrný rozdíl statisticky průkazný ve prospěch M+ prýtů (viz graf 5-5-15 a 5-5-22).

5.7.5.SWEET3c (ST1) nevykazuje výraznou změnu exprese v kořenech, v prýtu však ano

Přestože je exprese genu SWEET3c (ST1) významně rozdílná ve třetím časovém bodě (po 63 dnech) ve prospěch NM kořenů, vyhodnotil jsem tento rozdíl v porovnání s rozdíly ostatních genů jako zanedbatelný. Expresa tohoto genu je velmi podobná ve všech třech časových bodech (viz graf 5-5-1), ve druhém dokonce shodná.

V NM prýtu je však jeho exprese zvýšená, v prvním a třetím časovém bodě (po 35 a 63 dnech) průkazně (viz graf 5-5-12).

5.7.6.ST10 má mírně zvýšenou expresi v M+ prýtu

Ve třetím časovém bodě (po 63 dnech) je prokazatelný menší útlum exprese v M+ prýtu (viz graf 5-5-21), tedy v M+ prýtu zůstává upregulován. V prvním a druhém bodě je exprese také vyšší, avšak neprůkazně.

5.7.7.Mtst1 (ST2), SWEET1b (ST3), GPT1 (ST5), ST6 a ST9 jsou velmi slabě exprimovány v prýtu

Těchto 5 genů dosahuje velmi nízkého počtu kopií (pod 60) na ng RNA, více než 40 krát slaběji exprimované než v kořeni a často také velkého rozptylu (viz grafy 5-5-13, 5-5-14, 5-5-16, 5-5-17 a 5-5-20). SWEET1b (ST3) a GPT1 (ST5) jsou z této pětice exprimovány nejvíce (relativně k expresi v kořenech cca 40x a 50x slaběji) a vykazují podobně nízké expresní hodnoty, pouze GPT1 (ST5) průkazně navyšuje svou expresi ve třetím časovém bodě (po 63 dnech). Zbylé tři geny považuji za téměř neexprimované, protože jejich exprese je relativně k expresi v kořenech cca 280x nižší pro ST6, 500x nižší pro Mtst1 (ST2) a 1250x nižší pro ST9.

5.7.8. TEF1 (ref2) nevykazuje průkazné rozdíly ve své expresi

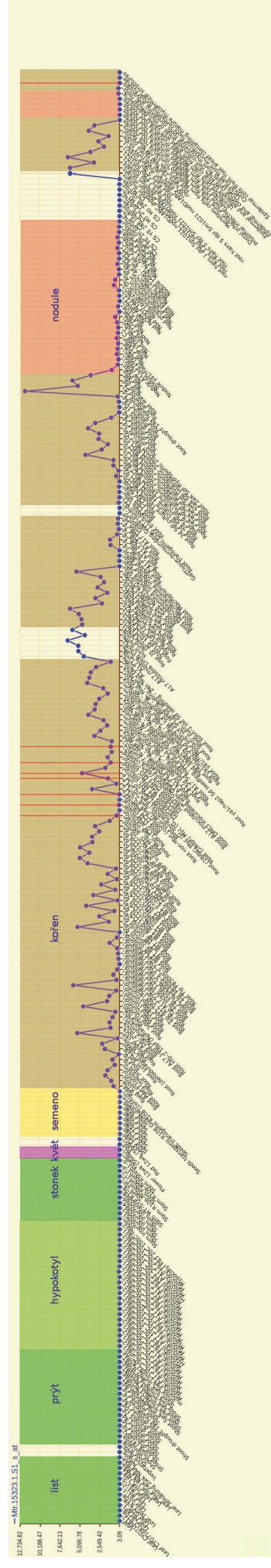
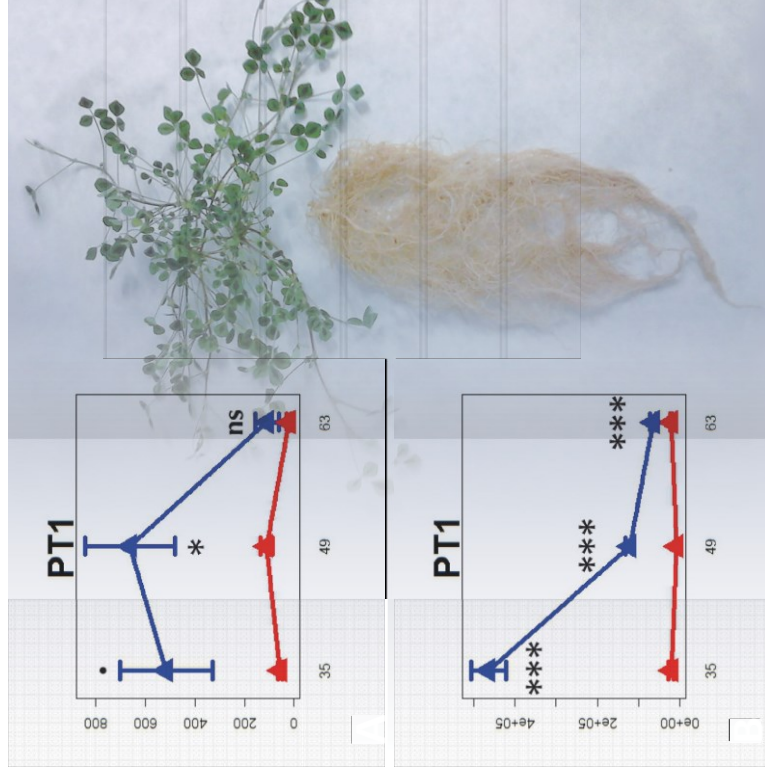
Druhý referenční gen (translační elongační faktor 1 = TEF1, ref2) byl exprimován na podobných hladinách v M+ i NM prýtu i kořeni (viz grafy) a tyto rozdíly nejsou statisticky průkazné.

5.8. Neznámý protein ST9 je membránový přenašeč z rodiny MFS

Z hledání klíčového slova „transmembrane“ bylo vybráno 6 genů se specifickou expresí v M+ kořenech, které pravděpodobně kódují blíže neurčený membránový protein („putative transmembrane protein“). Ty jsem podrobil *in silico* analýze (viz grafika). ST9 byl jediný, který pravděpodobně obsahuje 12 transmembránových helixů, což je charakteristickým rysem přenašečů z rodiny MFS (Major Facilitator Superfamily, viz současné poznání). Porovnávání jeho sekvence programem BLAST našlo nejvíce podobné proteiny zejména mezi bobovitými rostlinami (*Fabaceae*) a nedávalo žádný výsledek v čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*).

4 Grafika PT1: Grafy pro fosfátový transportér PT1

- A: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií amplikonů na ng extrahované RNA.
- B: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.
- C: Expresní data próby pro gen MtPT1 z databáze MtGEA. Svislé červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.

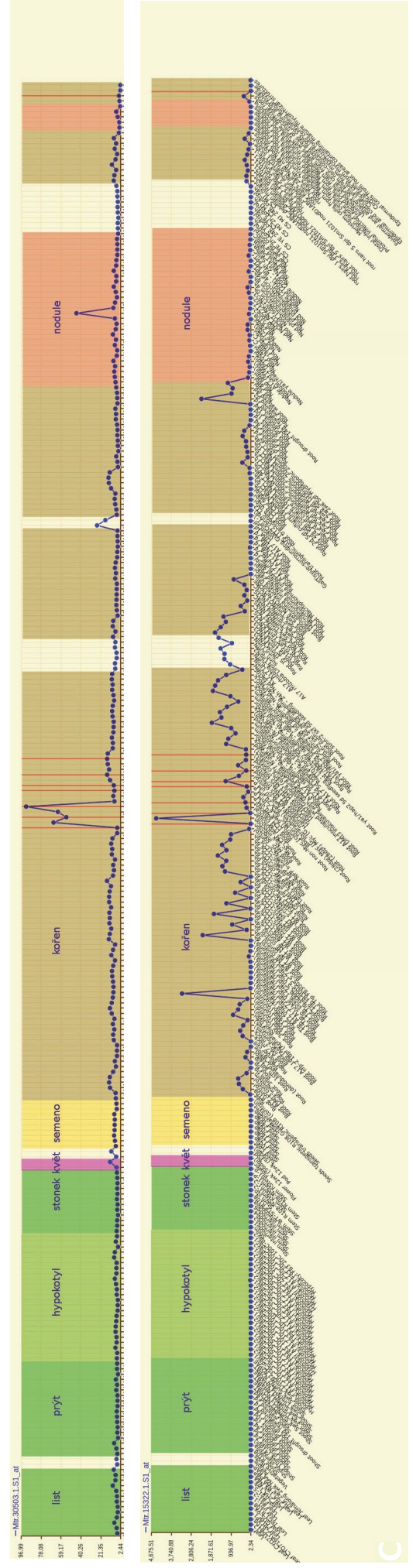
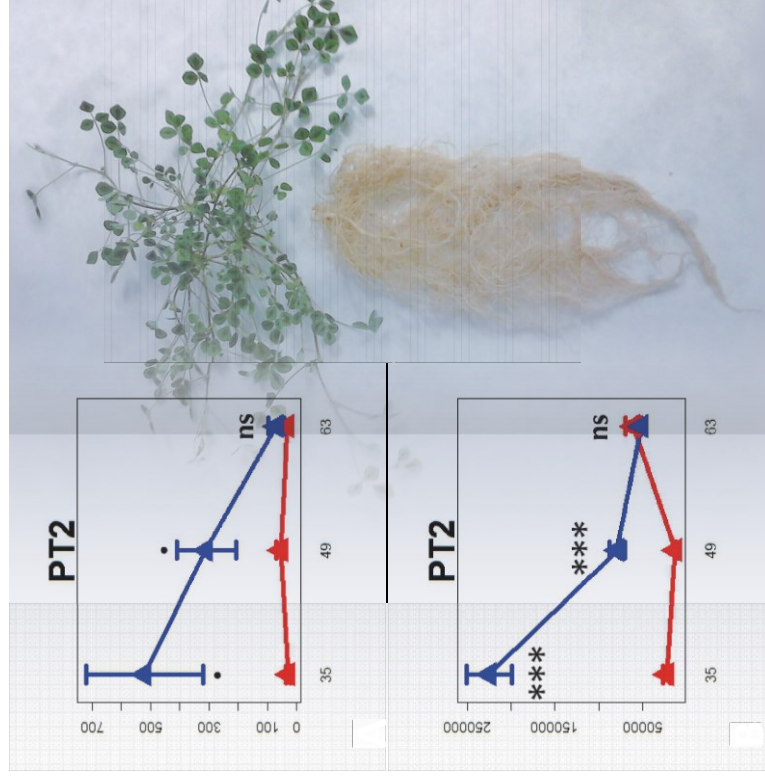


Grafika PT2: Grafy pro fosfátový transportér PT2

A: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií amplikonů na ng extrahované RNA.

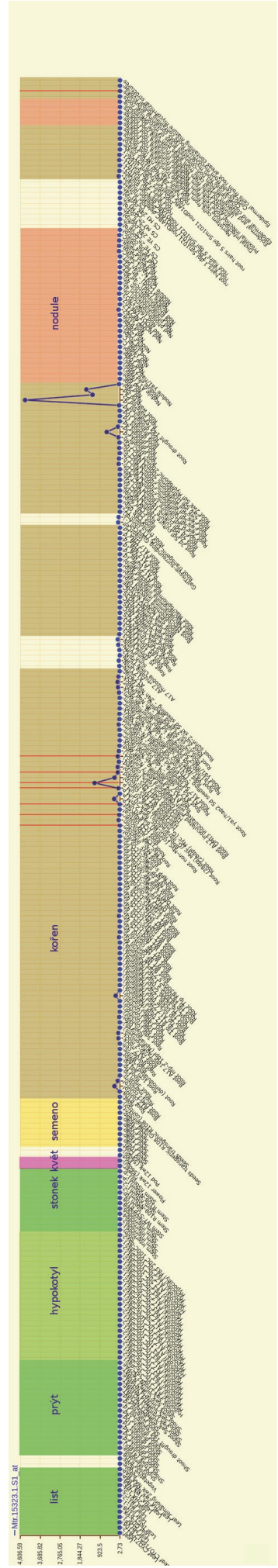
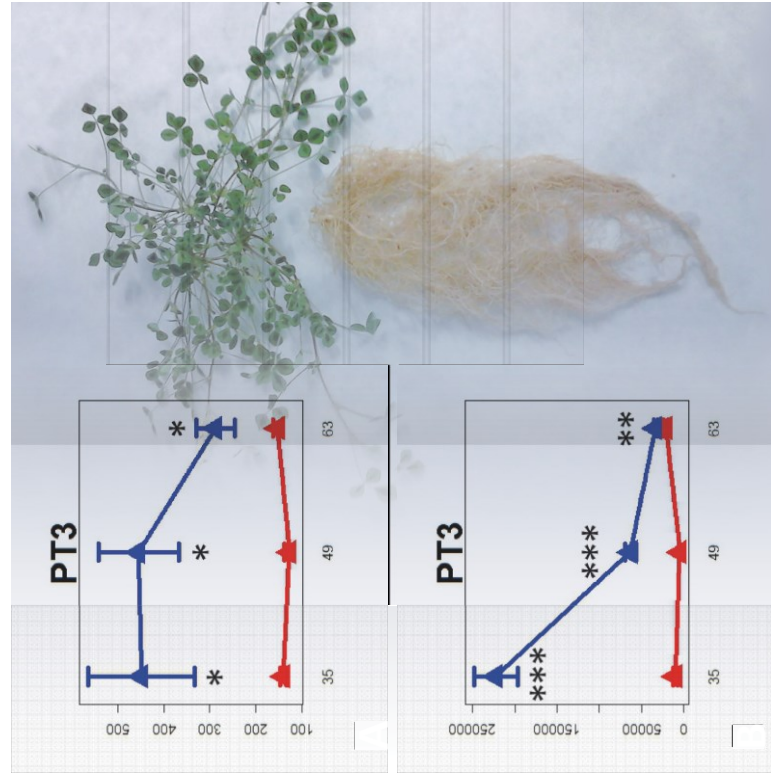
B: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.

C: Expresní data obou prýb pro gen MtPT2 z databáze MtGEA. Svislé červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.



Grafika PT3: Grafy pro fosfátový transportér PT1

- A: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií amplikonů na ng extrahované RNA.
- B: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.
- C: Expresní data próby pro gen MtPT3 z databáze MtGEA. Svislé červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.

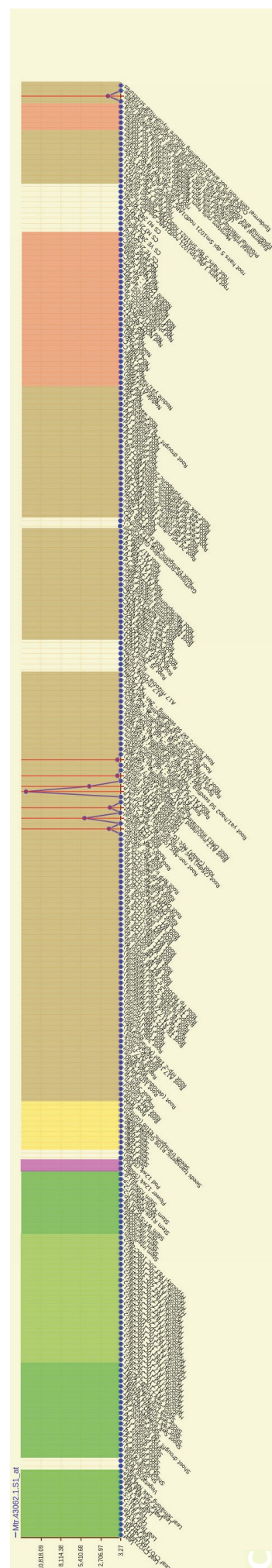
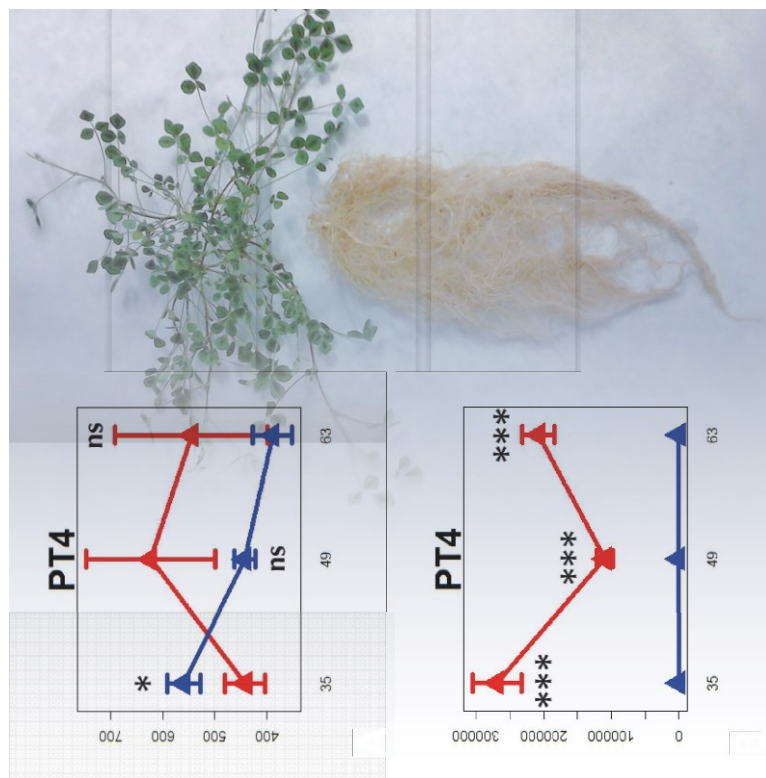


Grafika PT4: Grafy pro fosfátový transportér PT4

A: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií amplikonů na ng extrahované RNA.

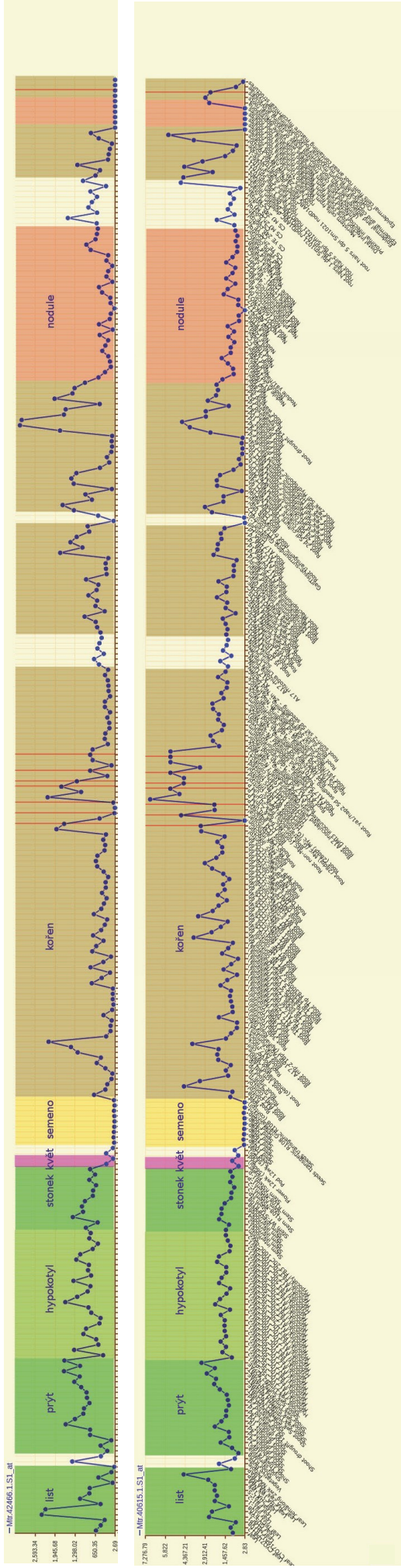
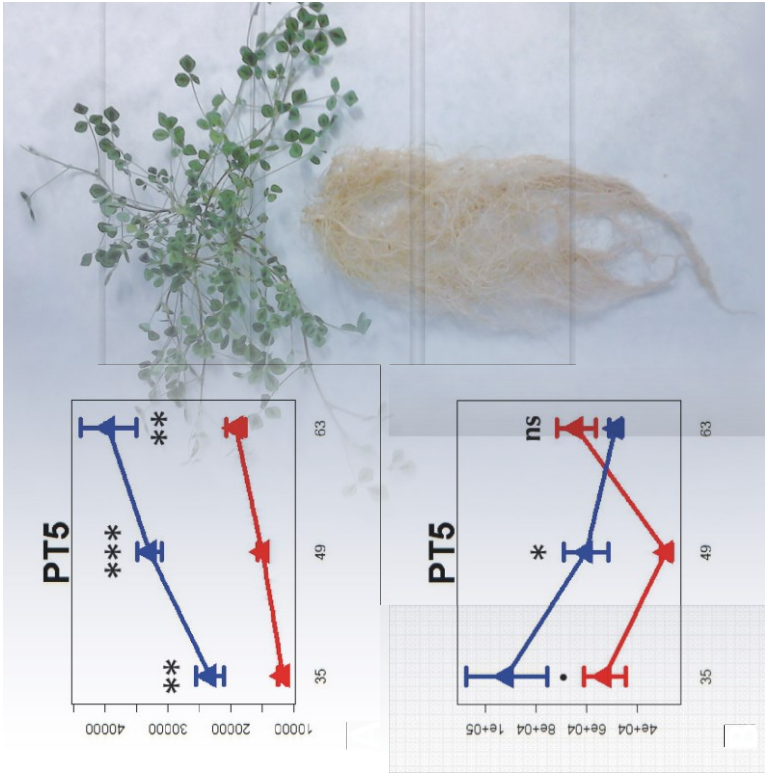
B: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.

C: Expresní data próby pro gen MtPT4 z databáze MtGEA. Svislé červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.



Grafika PT5: Grafy pro fosfátový transportér PT5

- A: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií amplikonů na ng extrahované RNA.
- B: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.
- C: Expresní data obou prýb pro gen MtPT5 z databáze MtGEA. Svislé červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.

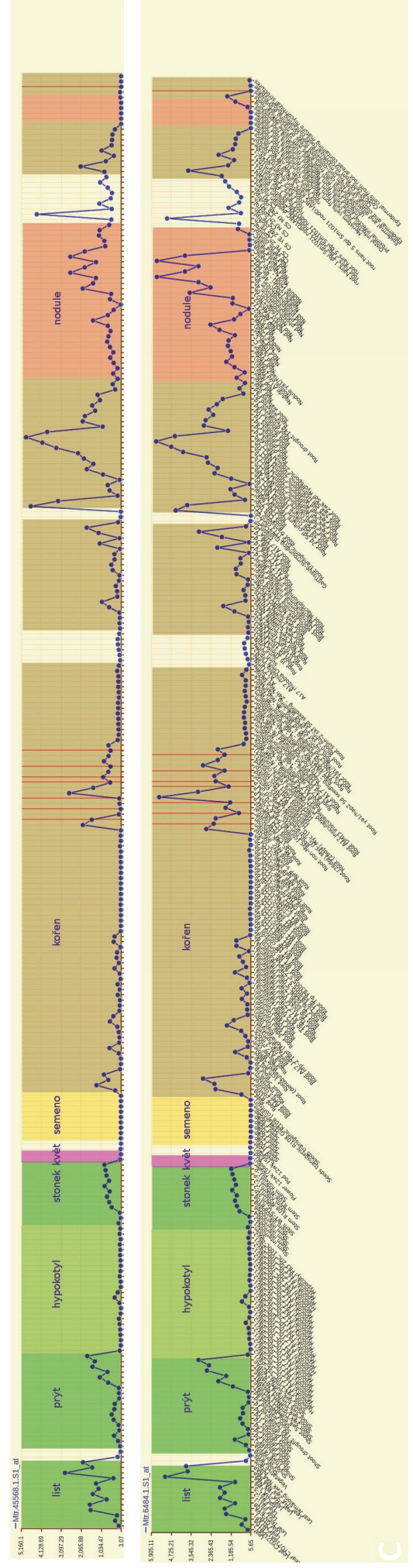
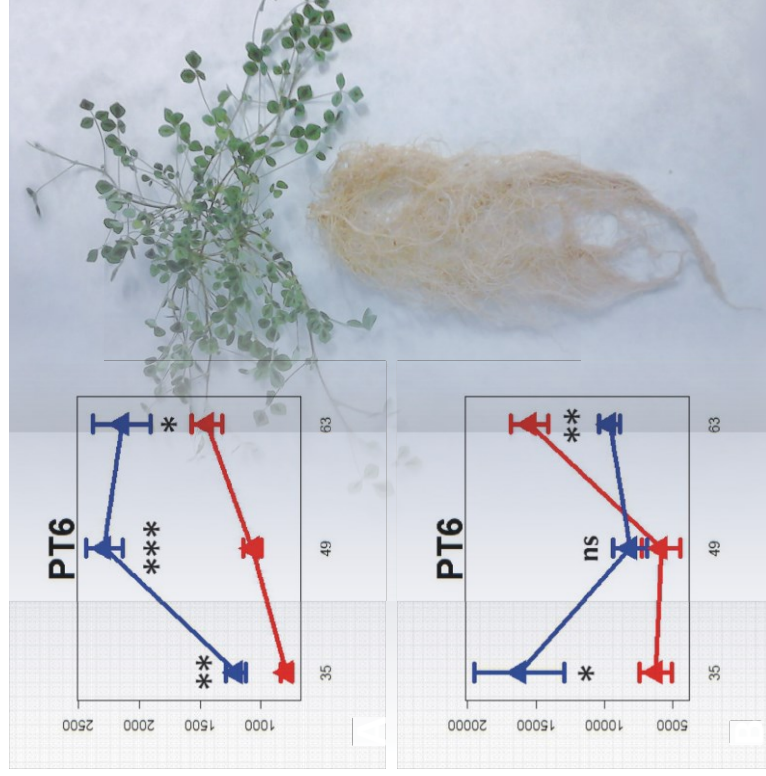


Grafika PT6: Grafy pro fosfátový transportér PT6

A: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií ampliconů na ng extrahované RNA.

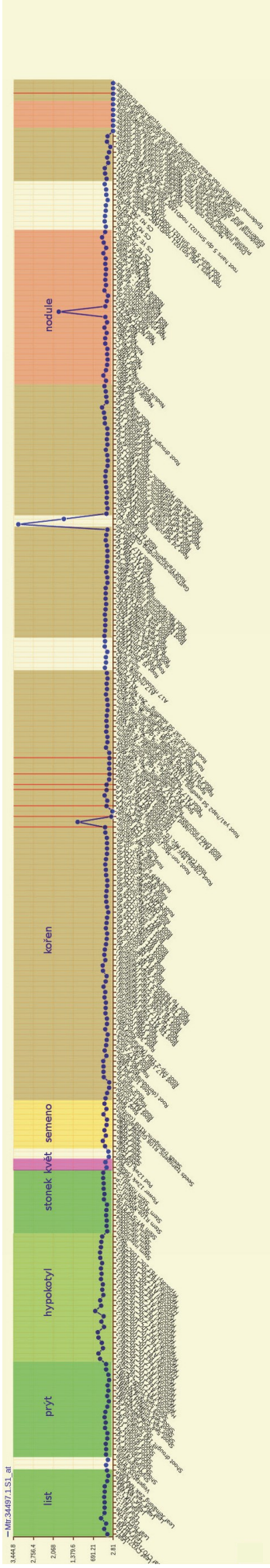
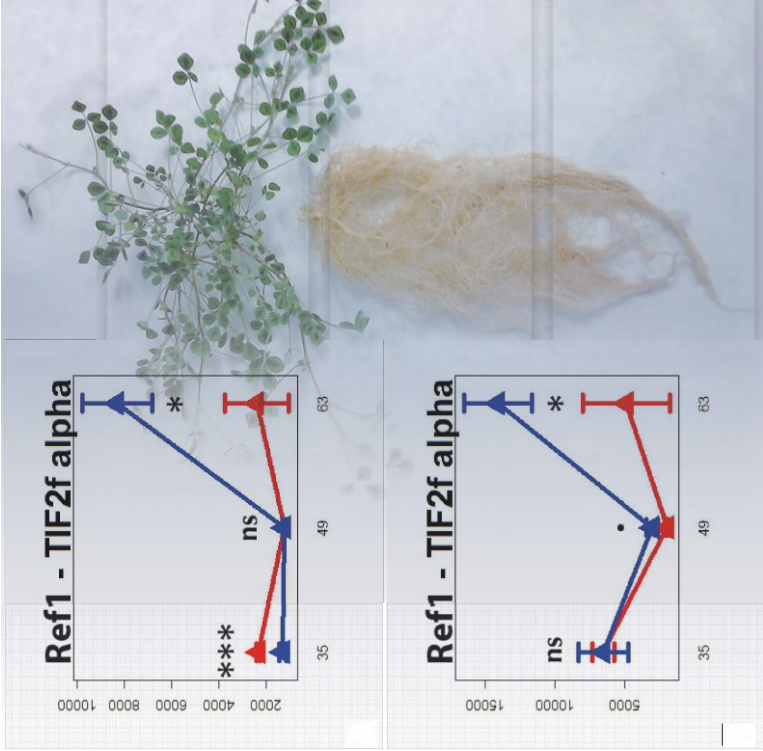
B: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.

C: Expresní data obou prýb pro gen MtPT6 z databáze MtGEA. Svislé červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.

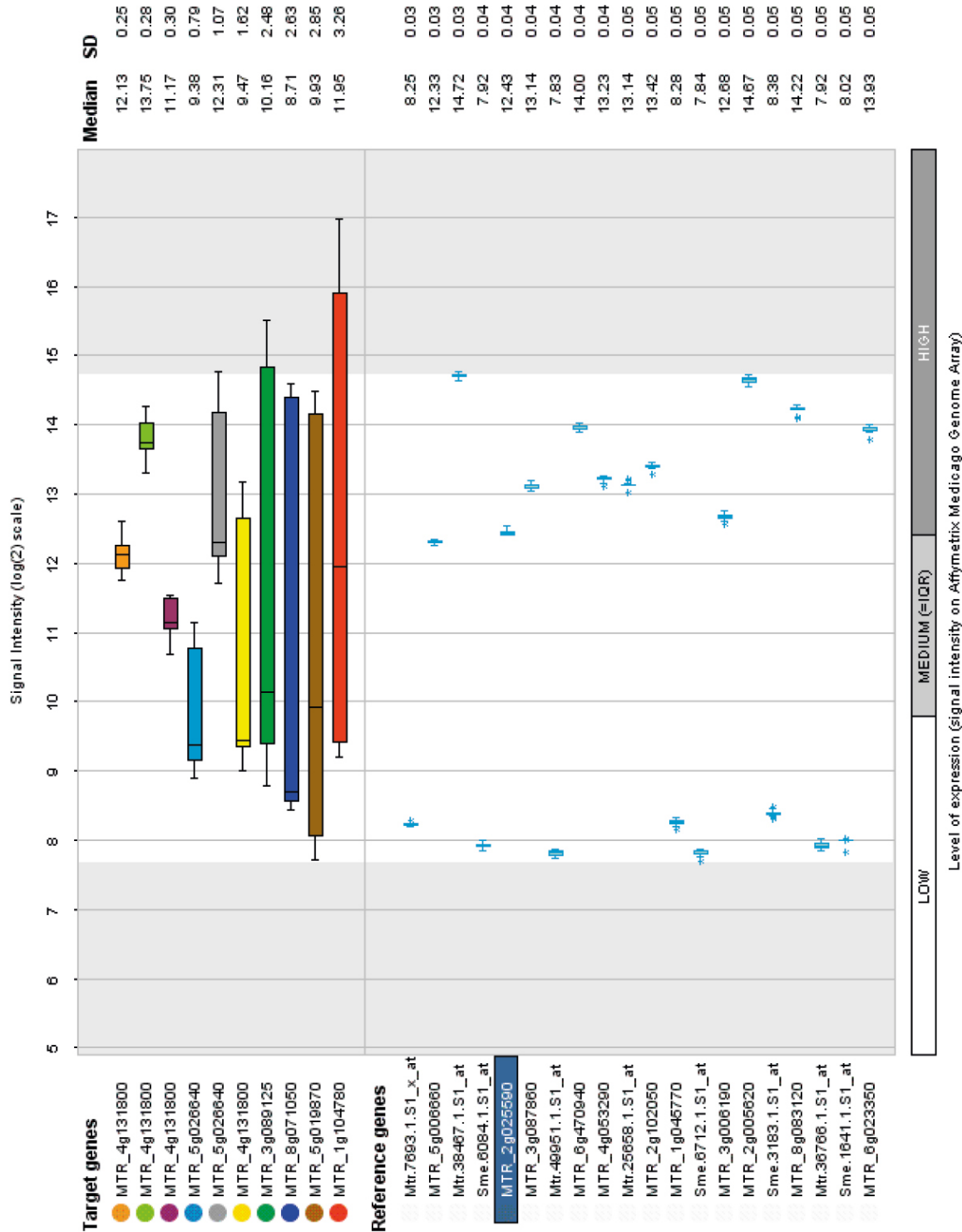


Grafika Ref1: Grafy pro transkripční iniciační faktor 2f podjednotka alfa

- A: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií ampliconů na ng extrahované RNA.
- B: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.
- C: Expresní data próby pro gen Ref1 z databáze MtGEA. Svislé červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.
- D: Záznam z aplikace RefGenes. Barevně 10 vybraných genů, genový symbol pro Ref1 zvýrazněn modře.



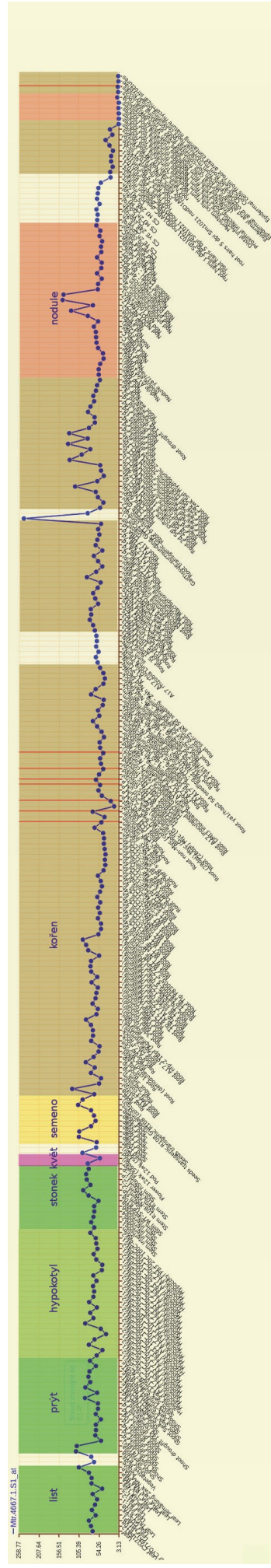
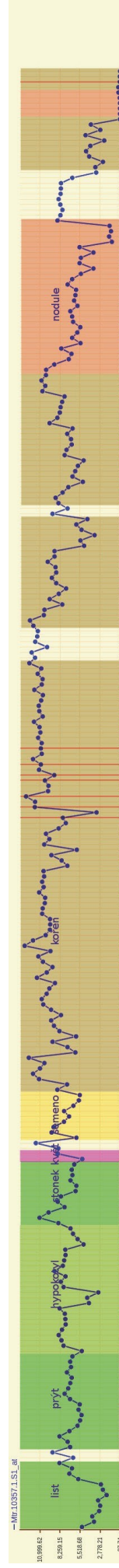
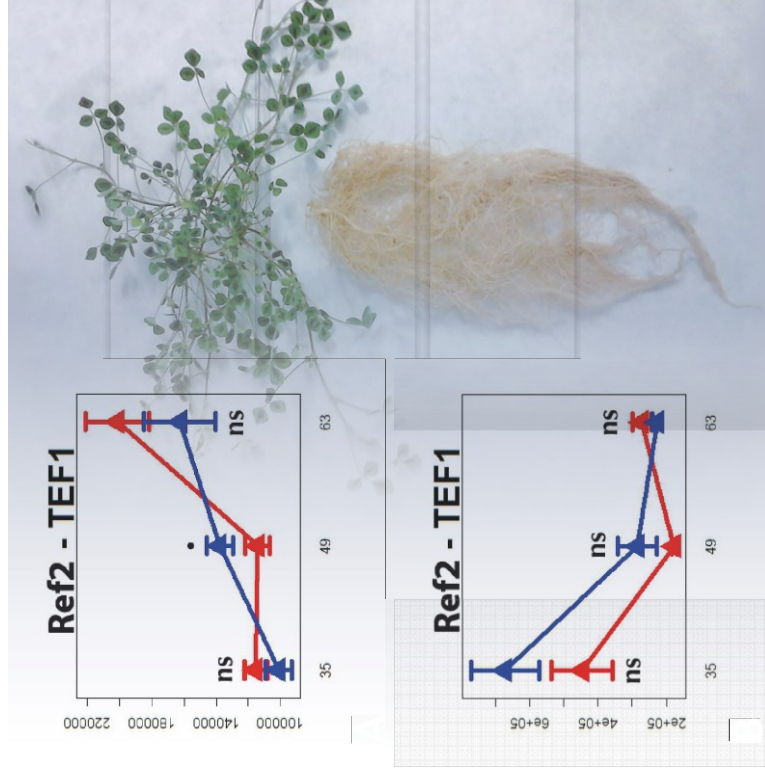
Dataset: 12 samples (sample selection: Jansa)



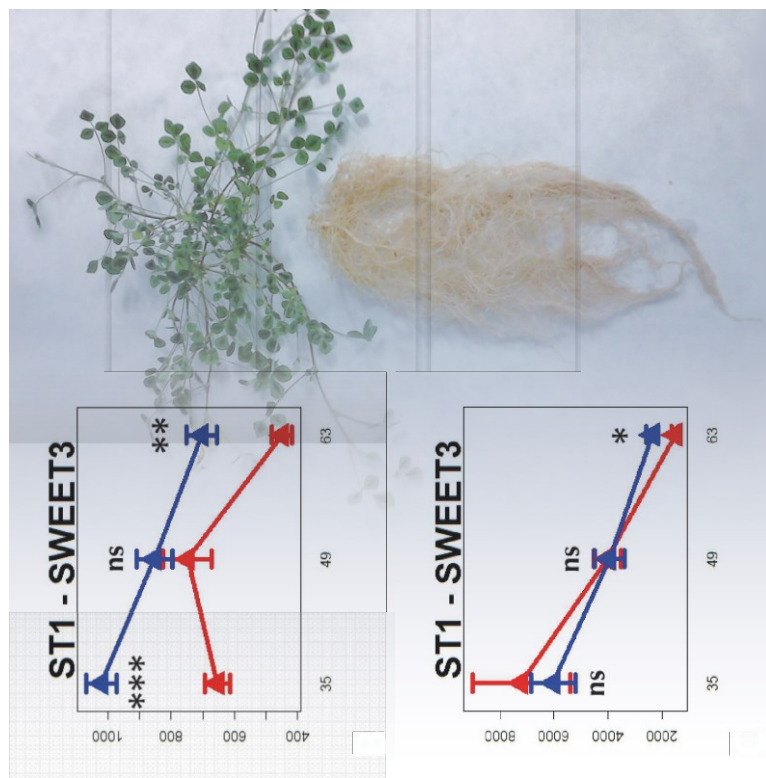
created with GENEVESTIGATOR

Grafika Ref2: Grafy pro tranlační elongační faktor 1

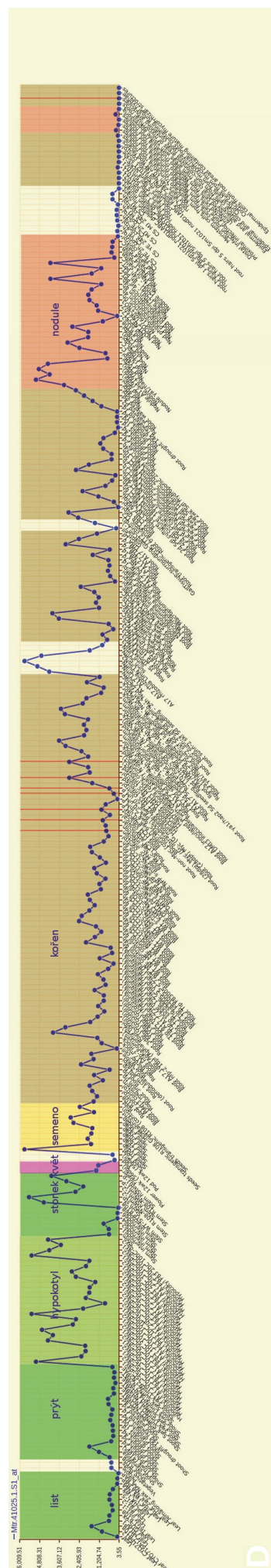
- A: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií amplikonů na ng extrahované RNA.
- B: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.
- C: Expresní data obou prýb pro gen Ref2 z databáze MtGEA. Svislé červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.



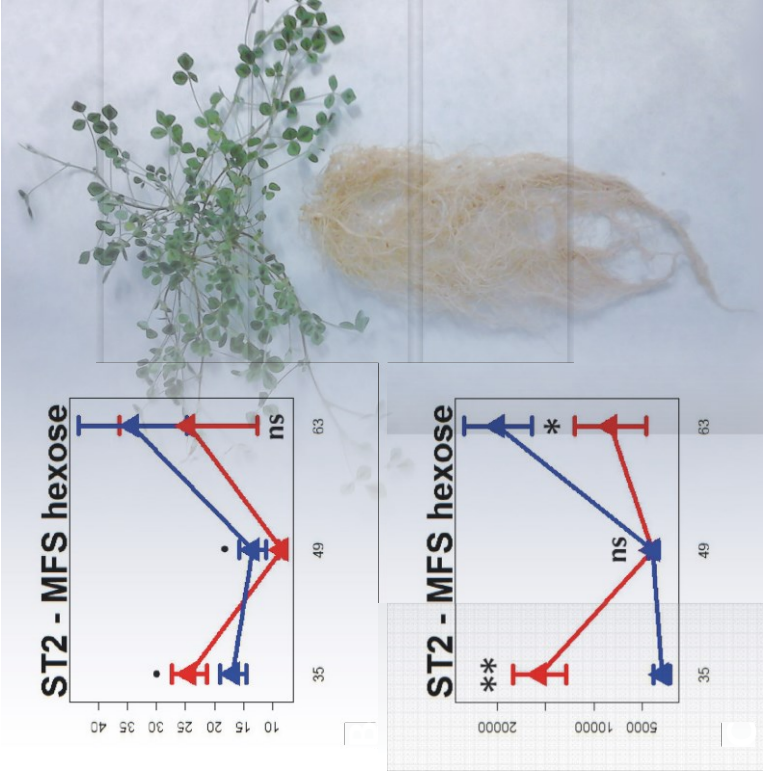
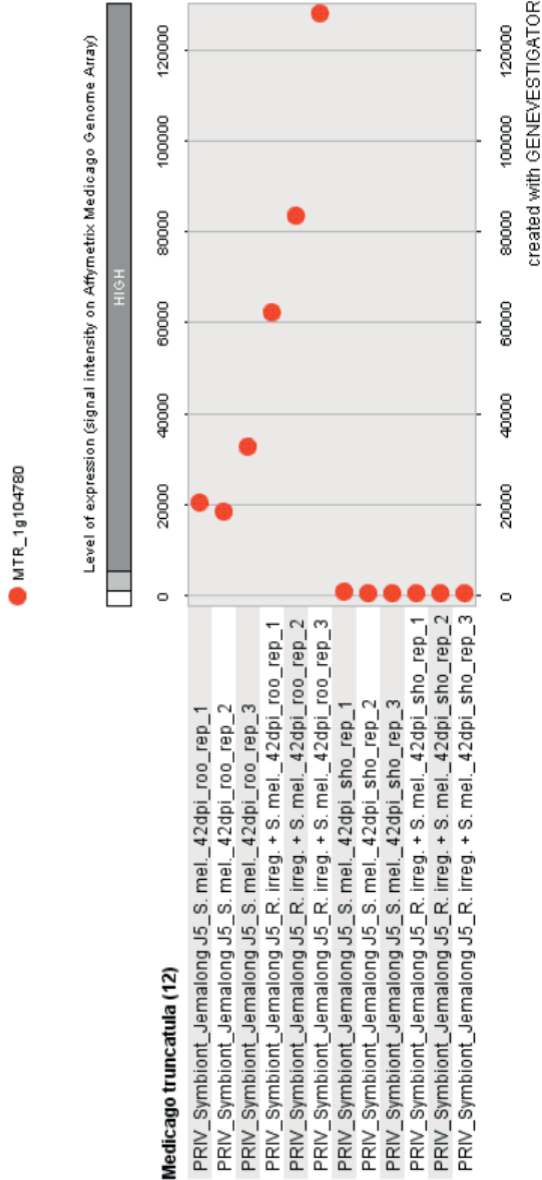
1 gene (gene selection: sugar 2)



A: Expresní potenciál próby pro ST1 z mikročipové analýzy znázorněn v aplikaci Geneinvestigator. Sestupně vždy po 3 řádcích: NM kořeny, M+ kořeny, NM prýt, M+ prýt.
B: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií amplikonů na ng extrahované RNA.
C: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.
D: Expresní data próby pro gen ST1 z databáze MtGEA. Svísle červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.

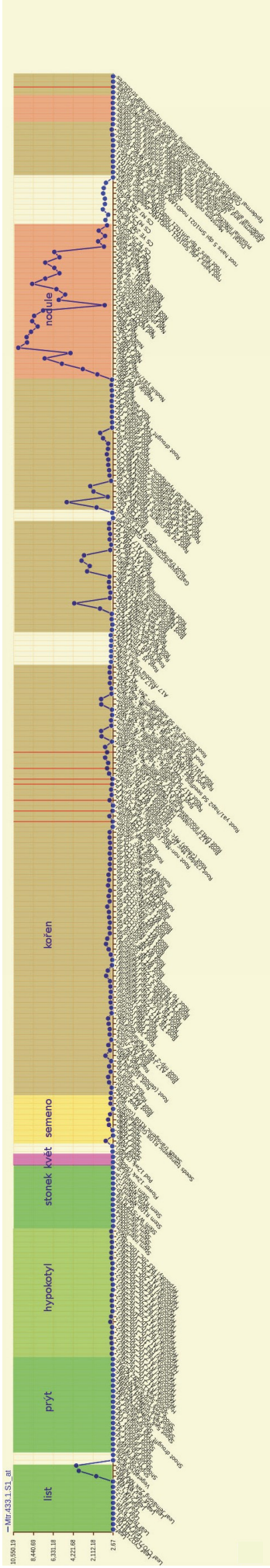


Dataset: 12 samples (sample selection: MT-SAMPLES-2)
1 gene (gene selection: sugar 2)

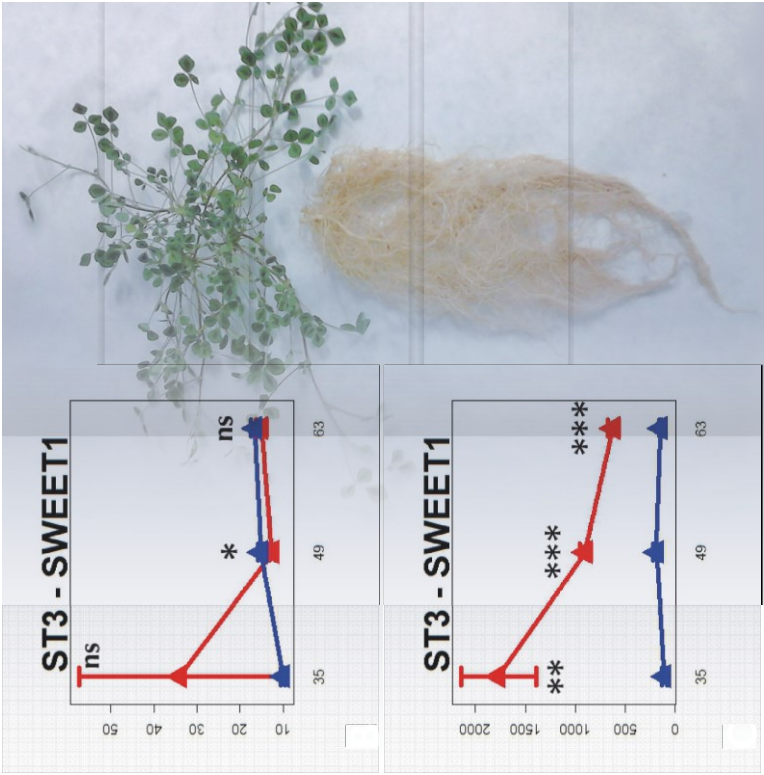
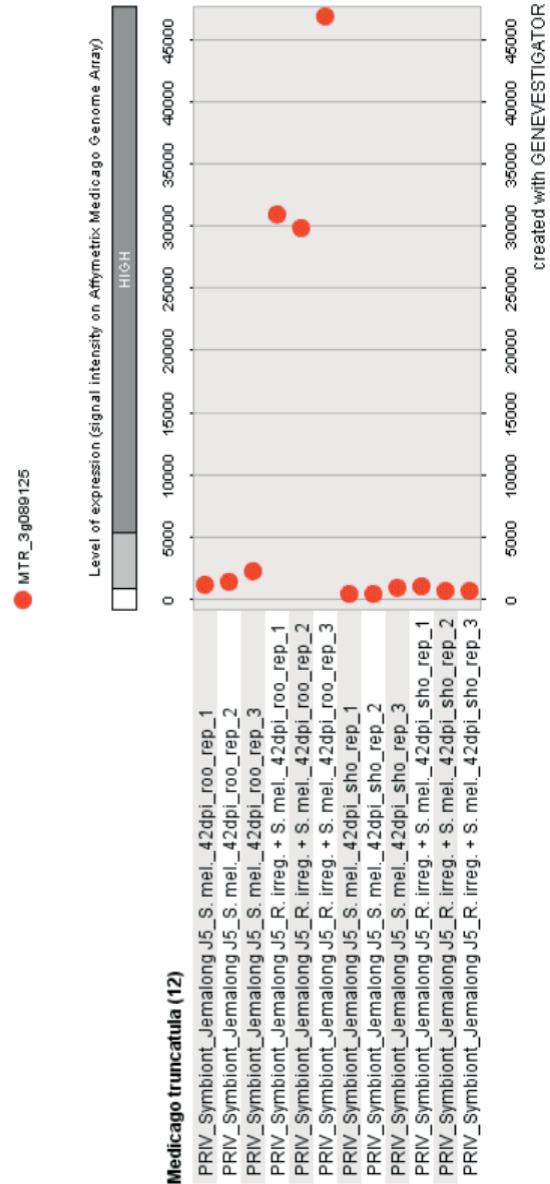


Grafika ST2: Grafy pro hexózový transportér Mtstt1

- A: Expresní potenciál próby pro ST2 z mikročipové analýzy znázorněn v aplikaci Geneinvestigator. Sestupně vždy po 3 řádcích: NM kořeny, M+ kořeny, NM prýt, M+ prýt.
- B: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií ampliconů na ng extrahované RNA.
- C: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.
- D: Expresní data próby pro gen ST2 z databáze MtGEA. Svislé červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.

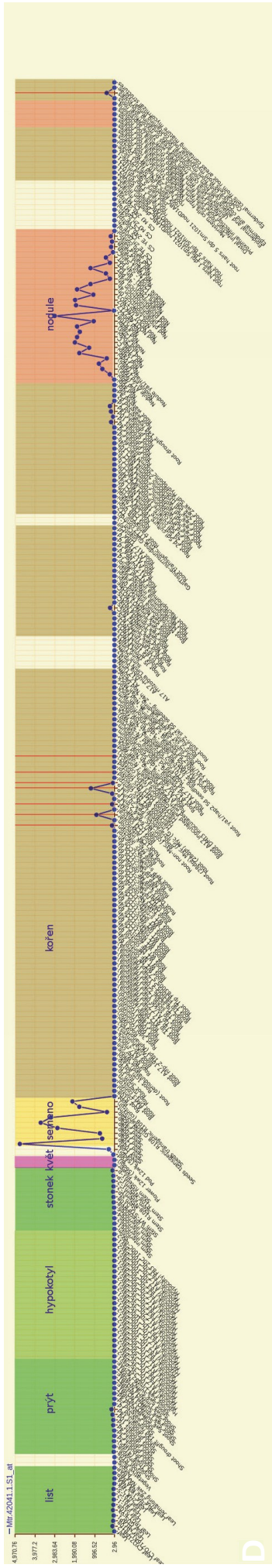


Dataset: 12 samples (sample selection: MT-SAMPLES-2)
1 gene (gene selection: sugar 2)



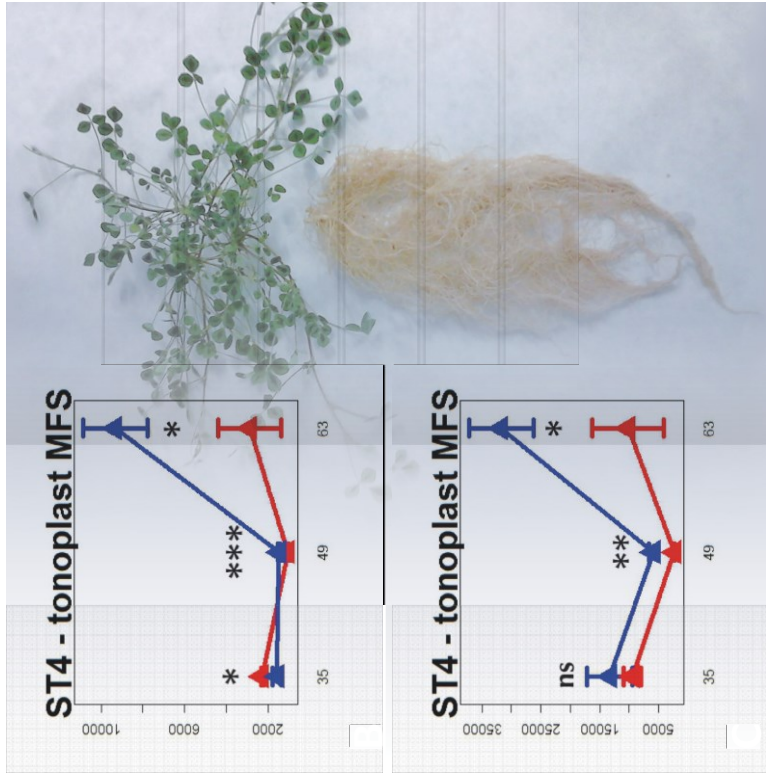
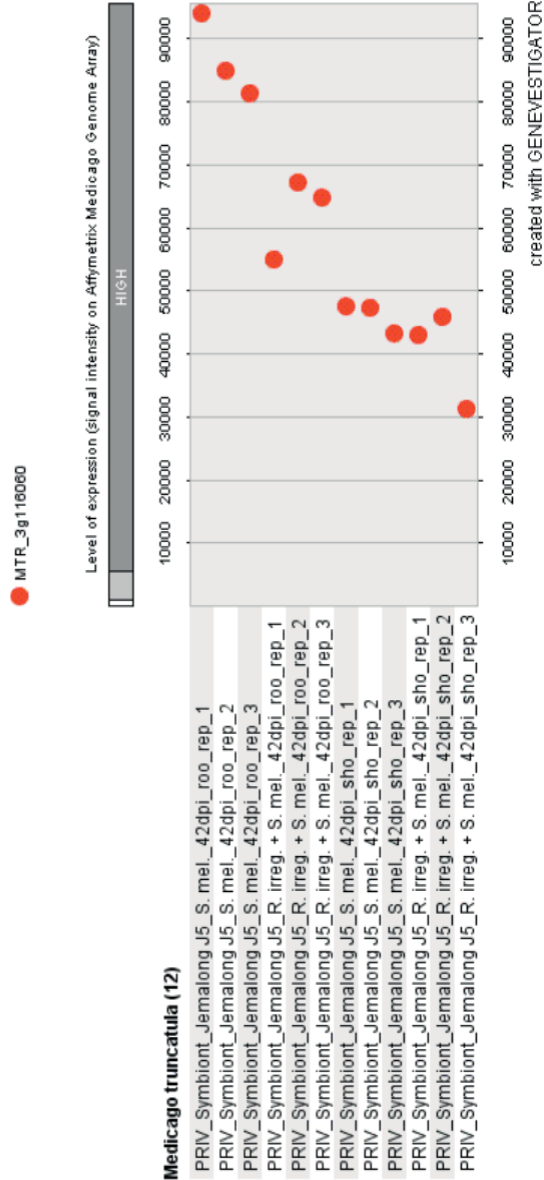
Grafika ST3: Grafy pro SWEET1b

- A: Expresní potenciál próby pro ST3 z mikročipové analýzy znázorněn v aplikaci Genevestigator. Sestupně vždy po 3 řádcích: NM kořeny, M+ kořeny, NM prýt, M+ prýt.
- B: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií ampliconů na ng extrahované RNA.
- C: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.
- D: Expresní data próby pro gen ST3 z databáze MtGEA. Svislé červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.



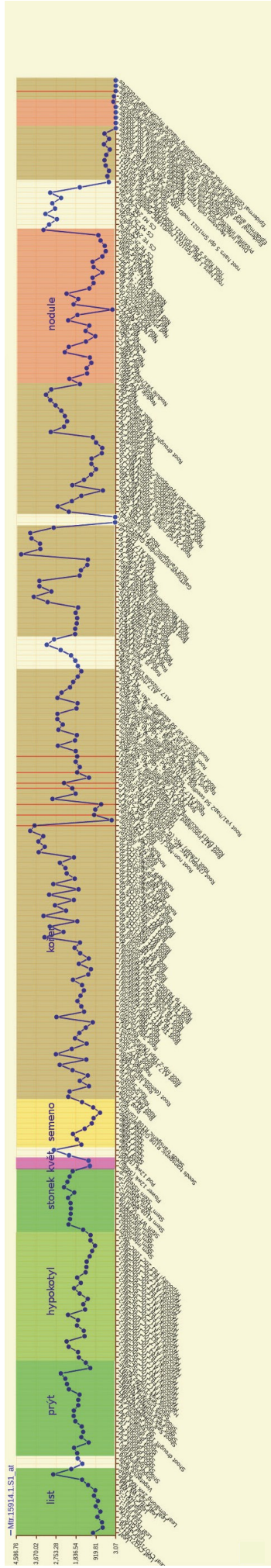
Dataset: 12 samples (sample selection: MT-SAMPLES-2)

1 gene (gene selection: monosaccharide transporters)

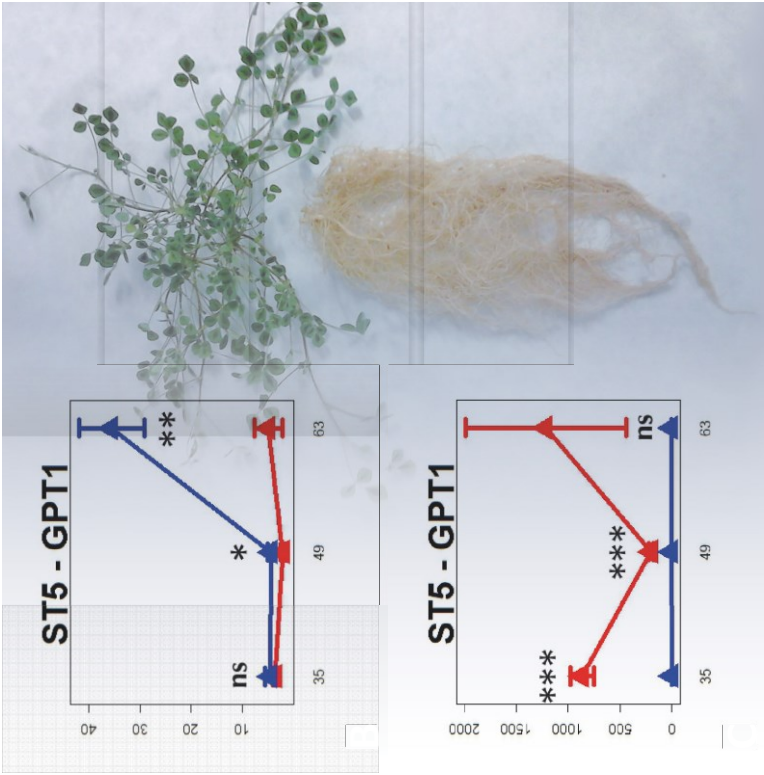
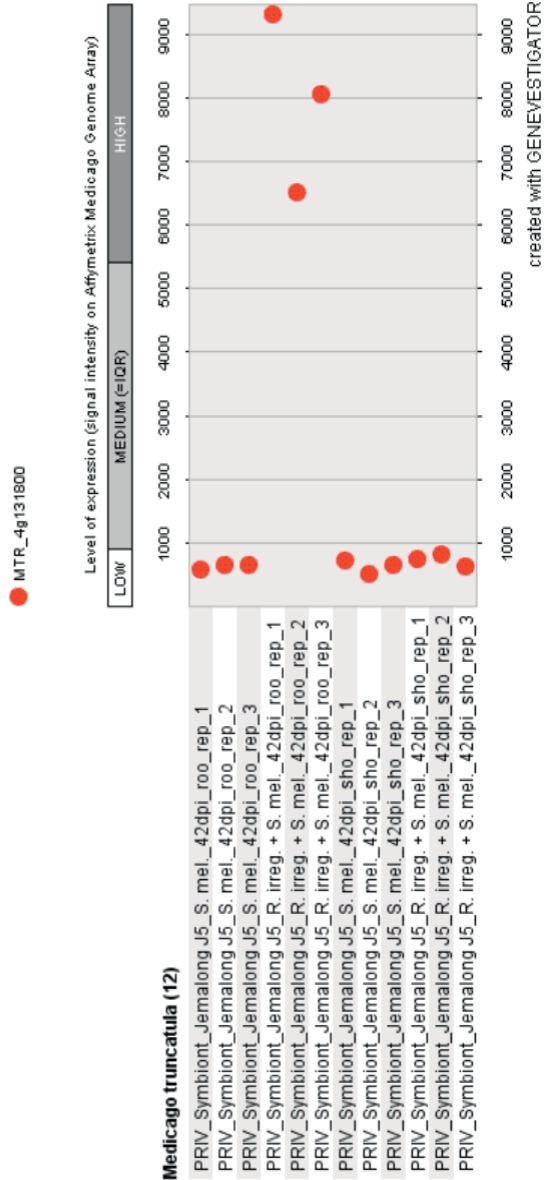


Grafika ST4: Grafy pro tonoplastový TMT

- A: Expresní potenciál próby pro ST4 z mikročipové analýzy znázorněn v aplikaci Genevestigator. Sestupně vždy po 3 řádcích: NM kořeny, M+ kořeny, M+ prýt, M+ prýt.
- B: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií ampliconů na ng extrahované RNA.
- C: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.
- D: Expresní data próby pro gen ST4 z databáze MtGEA. Svislé červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.

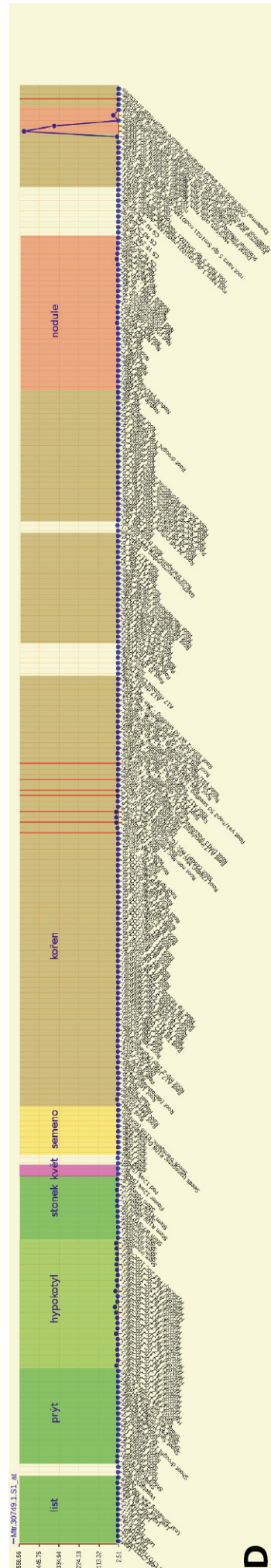
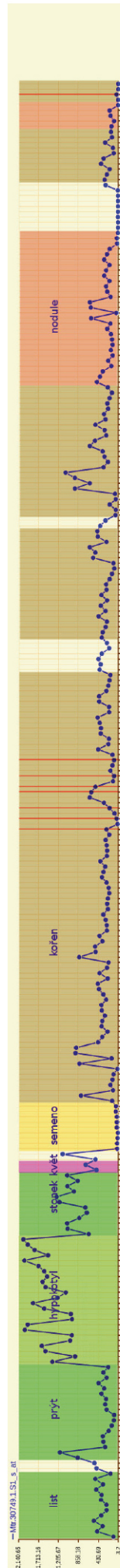
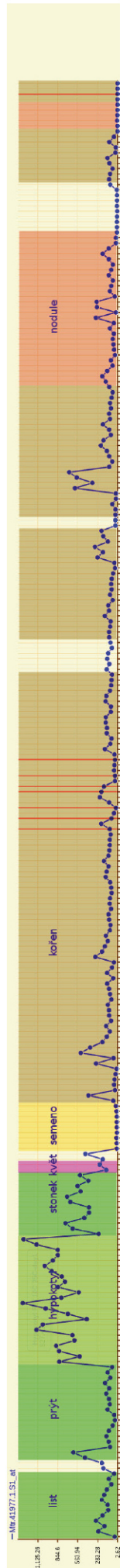
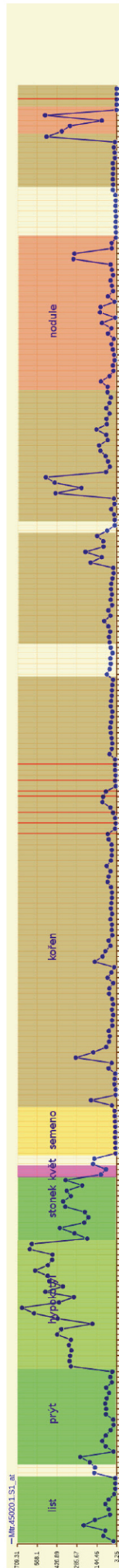


Dataset: 12 samples (sample selection: MT-SAMPLES-2)
1 gene (gene selection: sugar transporters)



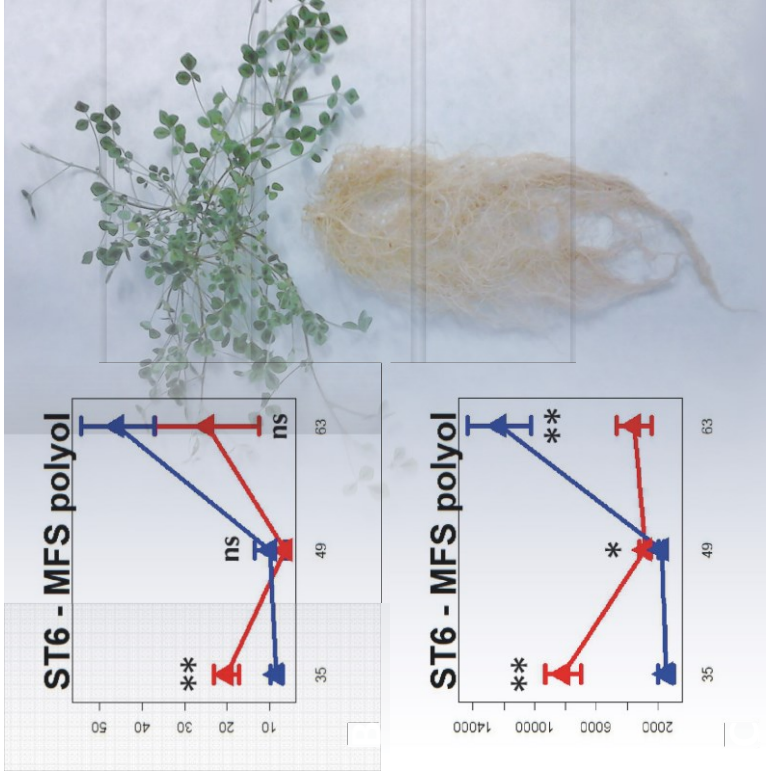
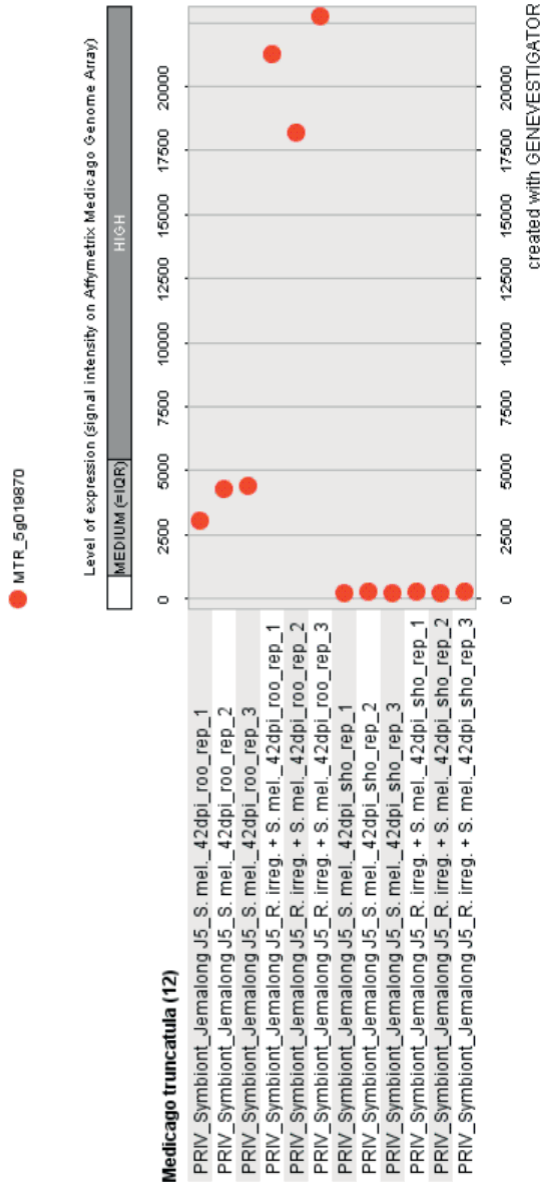
Grafika ST5: Grafy pro glukóza-6-fosfát/fosfátový transportér GPT1

- A: Expresní potenciál próby pro ST5 z mikročipové analýzy znázorněn v aplikaci Genevestigator. Sestupně vždy po 3 řádcích: NM kořeny, M+ kořeny, M+ prýt, M+ prýt.
- B: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií ampliconů na ng extrahované RNA.
- C: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.
- D: Expresní data pěti prýb pro gen ST5 z databáze MtGEA. Svislé červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.



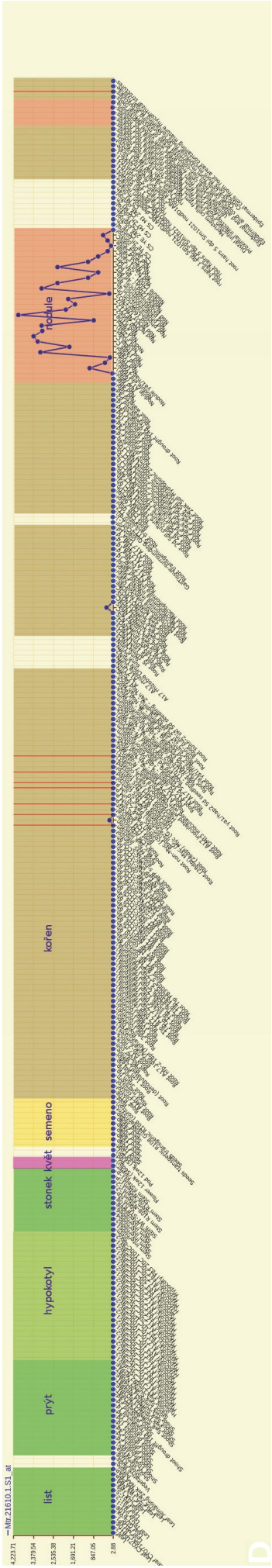
D

Dataset: 12 samples (sample selection: MT-SAMPLES-2)
1 gene (gene selection: monosaccharide transporters)

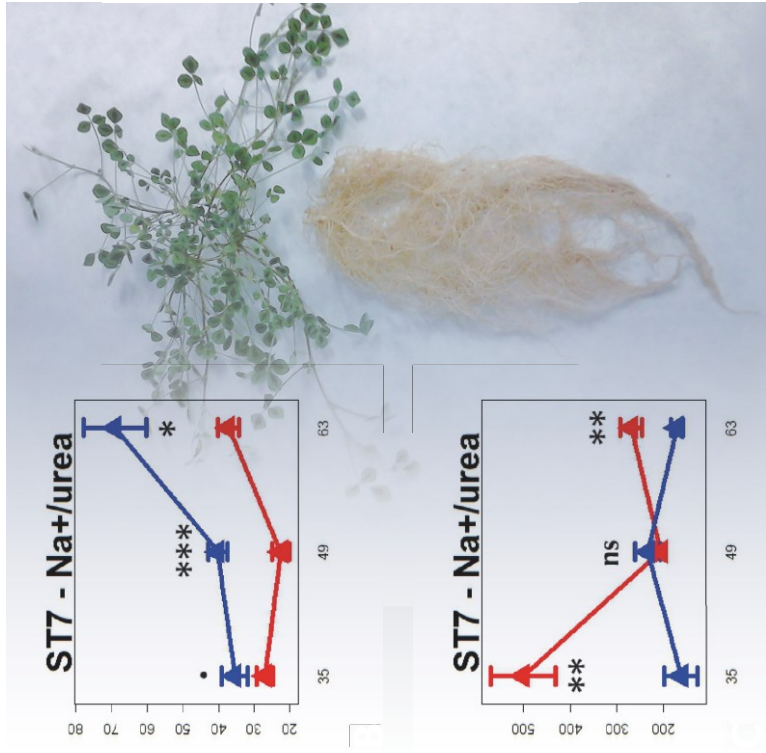
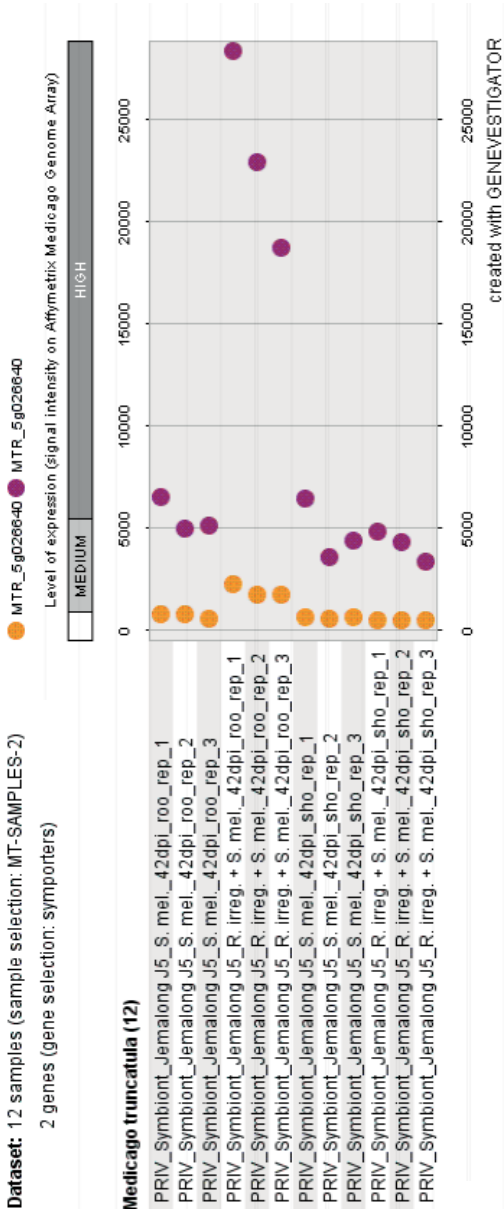


Grafika ST6: Grafy pro první polyol/monosacharidový přenašeč PMT

- A: Expresní potenciál próby pro ST6 z mikročipové analýzy znázorněn v aplikaci Geneinvestigator. Sestupně vždy po 3 řádcích: NM kořeny, M+ kořeny, NM prýt, M+ prýt.
- B: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií ampliconů na ng extrahované RNA.
- C: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.
- D: Expresní data próby pro gen ST6 z databáze MtGEA. Svislé červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.

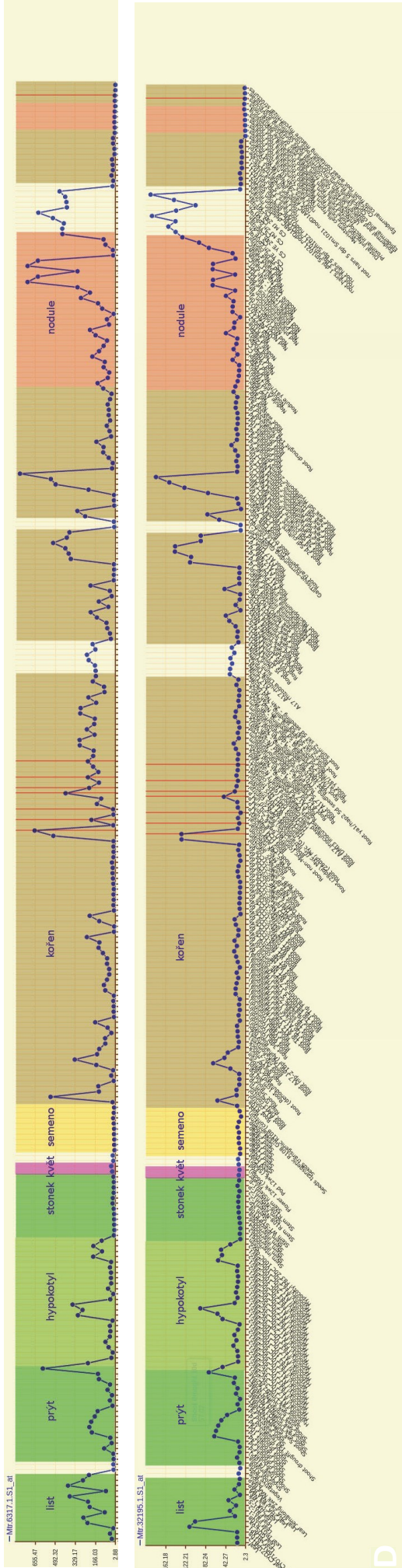


Dataset: 12 samples (sample selection: MT-SAMPLES-2)
2 genes (gene selection: symporters)

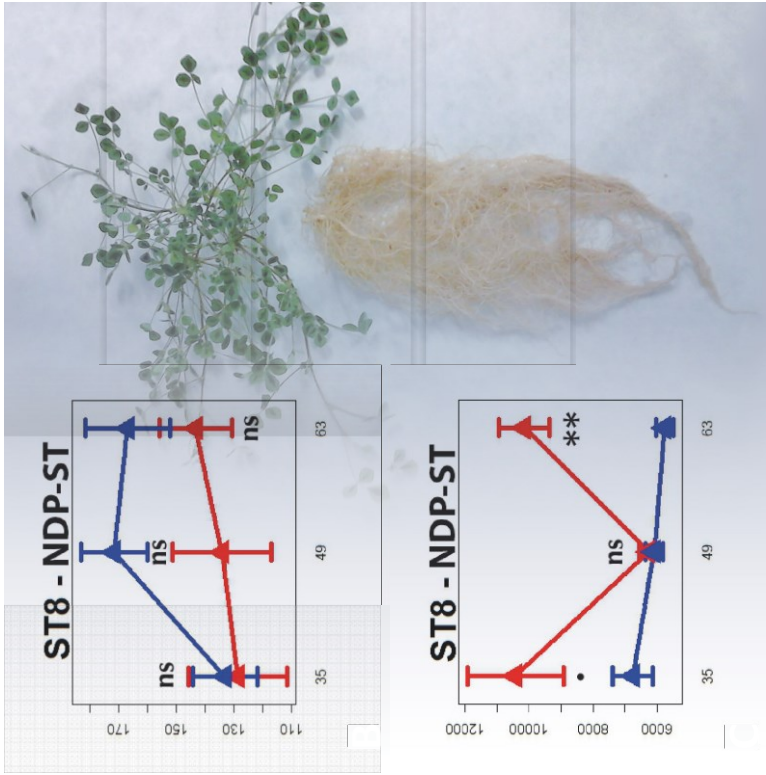
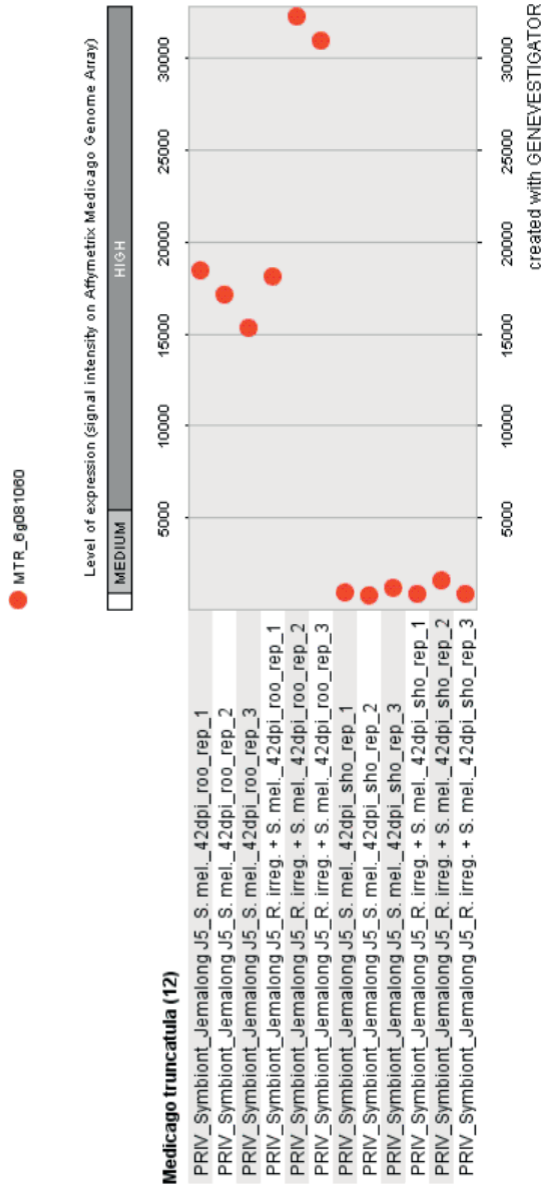


Grafika ST7: Grafy pro Na+/urea transportér ST7

- A: Expresní potenciál próby pro ST7 z mikročipové analýzy znázorněn v aplikaci Genevestigator. Sestupně vždy po 3 řádcích: NM kořeny, M+ kořeny, NM prýt, M+ prýt.
- B: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií amplikonů na ng extrahované RNA.
- C: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.
- D: Expresní data obou práb pro gen ST7 z databáze MtGEA. Svislé červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.

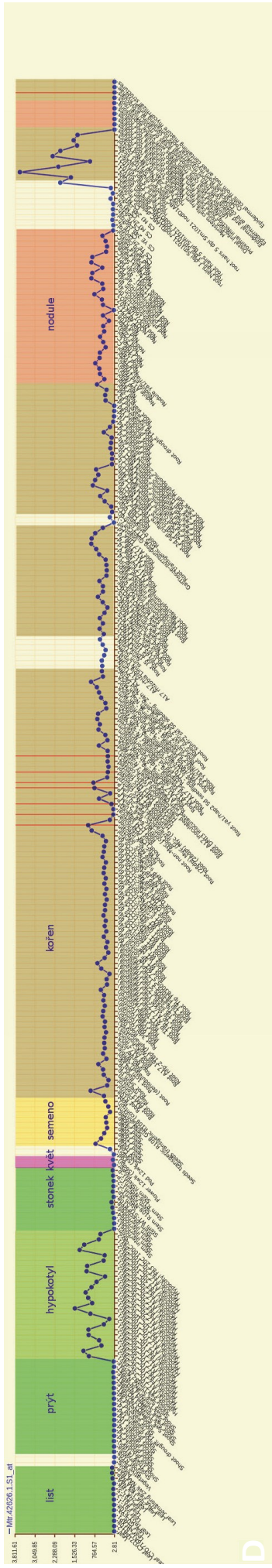


Dataset: 12 samples (sample selection: MT-SAMPLES-2)
1 gene (gene selection: sugar 2)

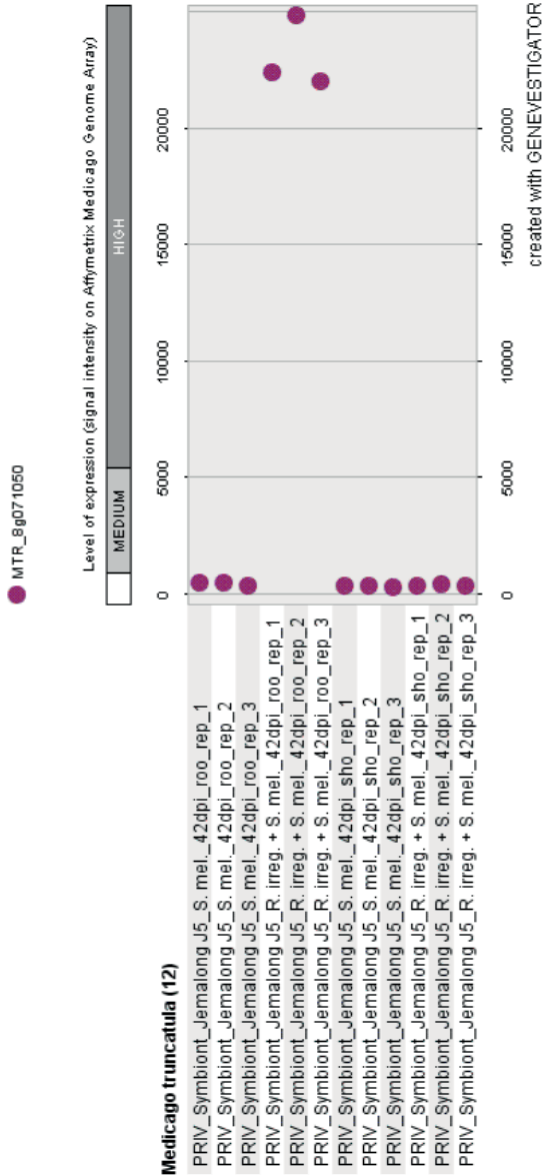
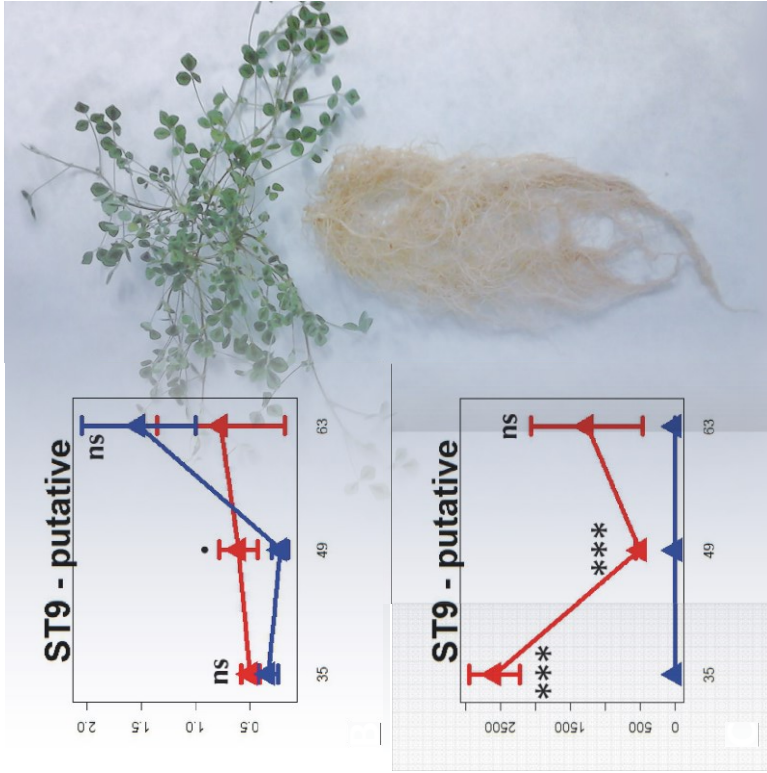


Grafika ST8: Grafy pro nukleotid-difosfo-cukernou transferázu

- A: Expresní potenciál próby pro ST8 z mikročipové analýzy znázorněn v aplikaci Genevestigator. Sestupně vždy po 3 řádcích: NM kořeny, M+ kořeny, NM prýt, M+ prýt.
- B: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií ampliconů na ng extrahované RNA.
- C: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.
- D: Expresní data próby pro gen ST8 z databáze MtGEA. Svislé červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.

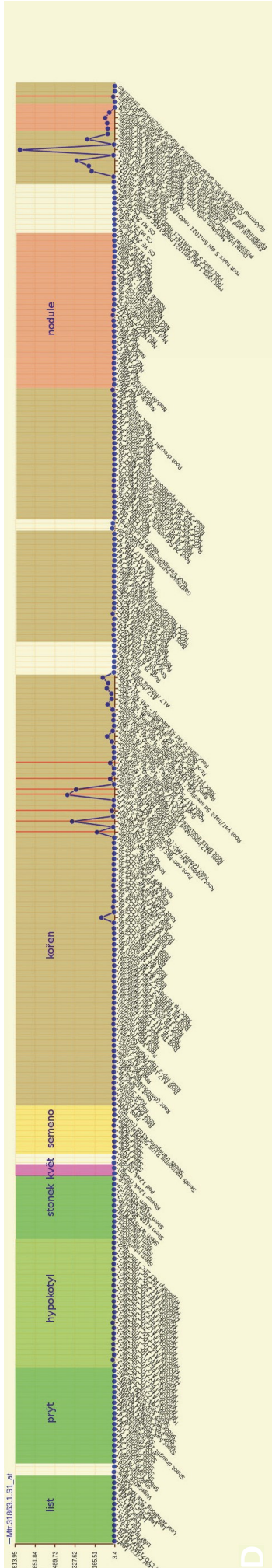


Dataset: 12 samples (sample selection: MT-SAMPLES-2)
1 gene (gene selection: transmembrane)



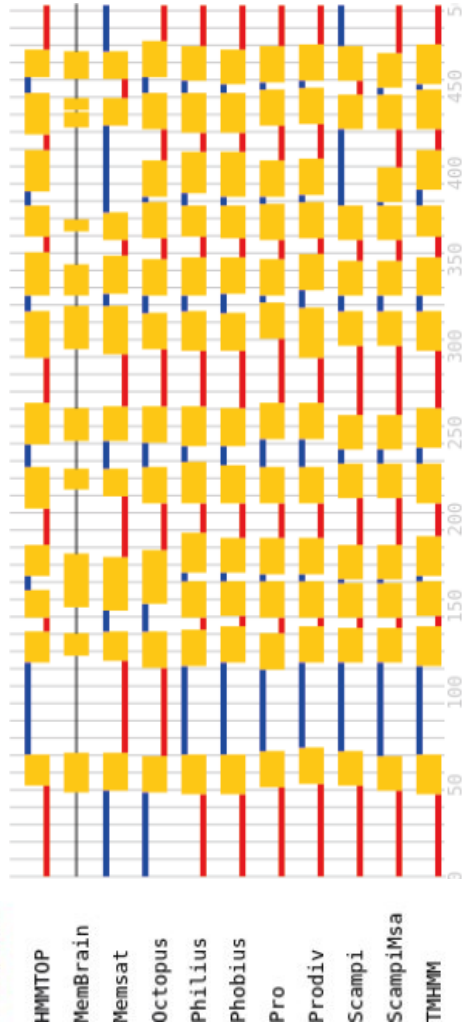
Grafika ST9: Grafy pro protein neznámé funkce

- A: Expresní potenciál próby pro ST9 z mikročipové analýzy znázorněn v aplikaci Genevestigator.
Sestupně vždy po 3 řádcích: NM kořeny, M+ kořeny, NM prýt, M+ prýt.
- B: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií amplikonů na ng extrahované RNA.
- C: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.
- D: Expresní data próby pro gen ST9 z databáze MtGEA. Svislé červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.
- E: Predikce topologie ST9 pomocí programu CCTOP. Žlutě predikované transmembránové helixy.
- F: Predikce topologie ST9 pomocí programu PredictProtein. Fialově predikované transmembránové helixy.
- H: Znázornění predikce lokalizace ST9 pomocí programu PredictProtein. Zeleně vyznačeno endoplazmatické retikulum.

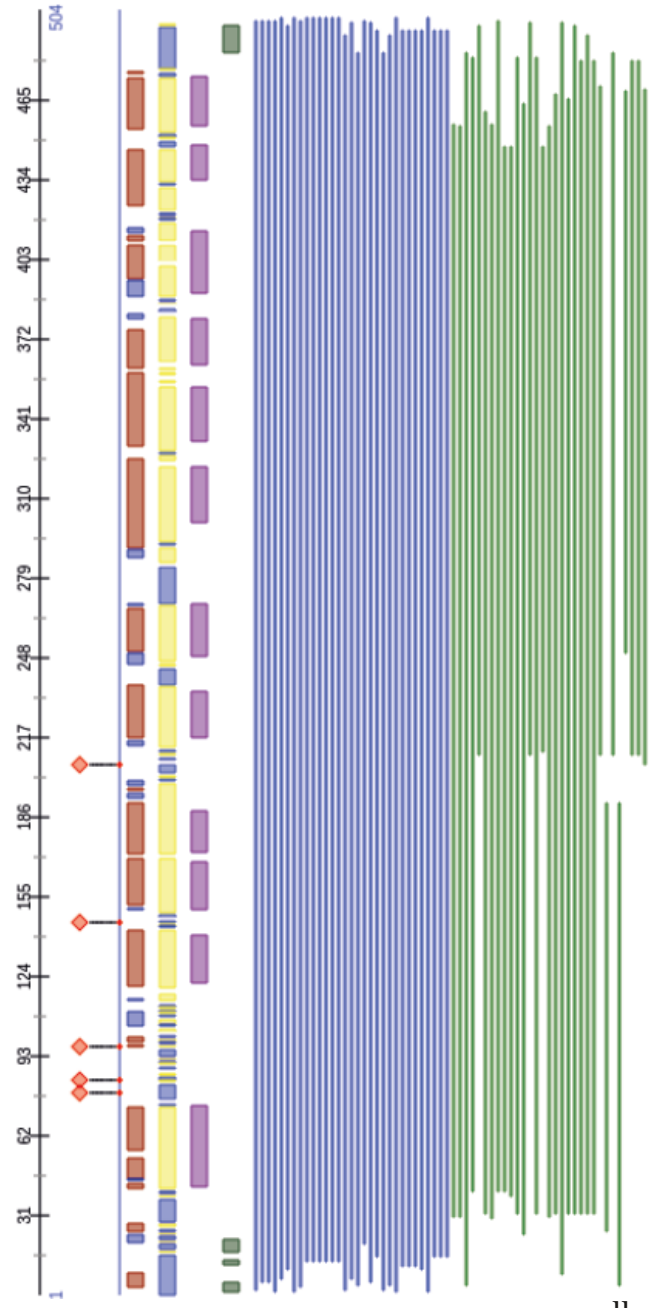




Predictions:



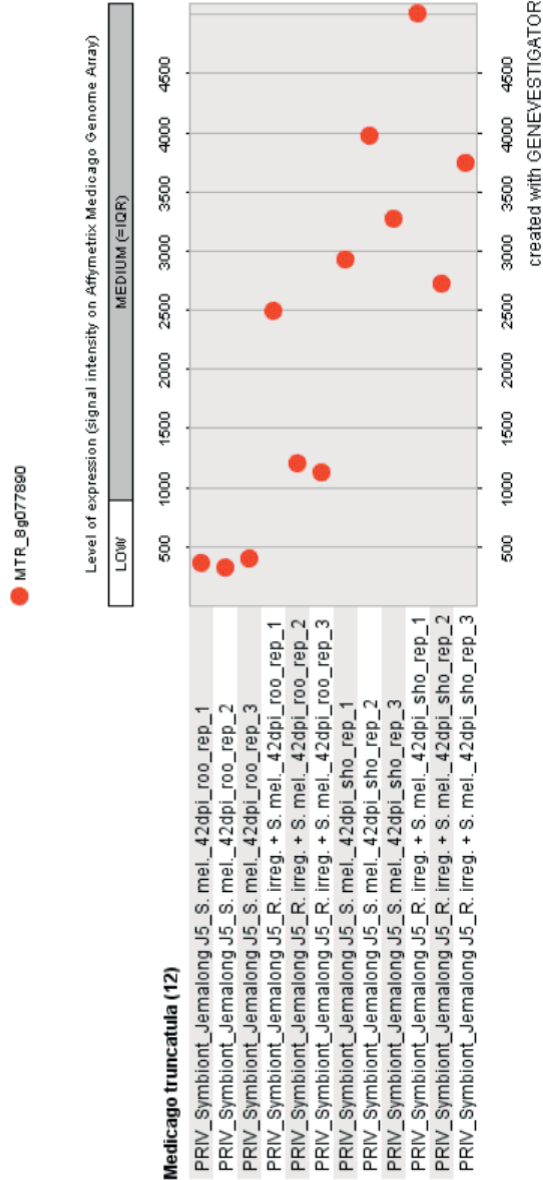
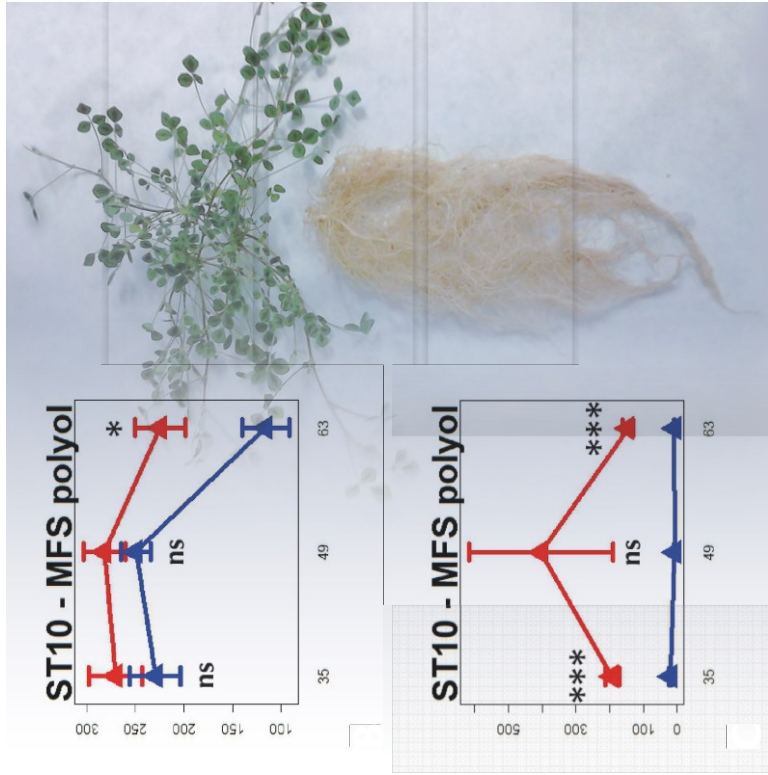
E



u..
163

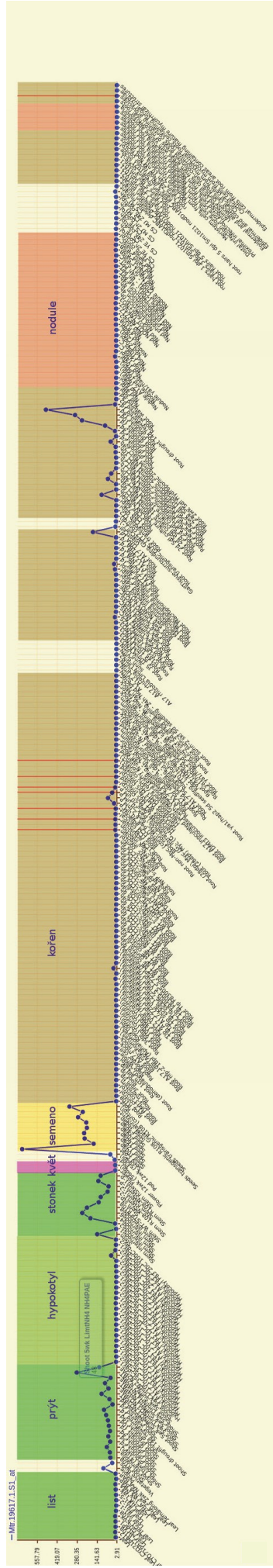


Dataset: 12 samples (sample selection: MT-SAMPLES-2)
1 gene (gene selection: monosaccharide transporters)



Grafika ST10: Grafy pro druhý polyol/monosacharidový transportér PMT

- A: Expresní potenciál próby pro ST10 z mikročipové analýzy znázorněn v aplikaci Genevestigator. Sestupně vždy po 3 řádcích: NM kořeny, M+ kořeny, NM prýt, M+ prýt.
- B: Expresní data z qRT-PCR pro prýťový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x: dní sklizně. Osa y: počty kopií ampliconů na ng extrahované RNA.
- C: Expresní data z qRT-PCR pro kořenový vzorek. M+ červeně, NM modře. Osa x a y jako u A.
- D: Expresní data próby pro gen ST10 z databáze MtGEA. Svislé červené čáry odpovídají vzorkům, ve kterých byl exprimován MtPT4.



6. Diskuze

Porovnání dvou variant rostlin – mykorhizních (M+) a nemyorhizních (NM) – jsem provedl na různých badatelských úrovních, a tomu i odpovídá širší diskutabilních závěrů. V úvodu je dobré zmínit, že rostliny narostlé ve skleníkovém pokusu skutečně byly dvě rozdílné, ale navzájem stále porovnatelné varianty. Z laického pohledu byly rostliny stejné, což potvrzuje porovnání suchých hmotností (viz výsledky), které ukazuje, že změny v dalších porovnávaných parametrech nebyly zapříčiněny rozdílnou velikostí či vzrůstem rostlin, ale udály se na fyziologické úrovni. A skutečně, obsah fosforu a dusíku – dvou hlavních makroprvků ve výživě rostlin – byl průkazně rozdílný mezi variantami a to ve prospěch mykorhizních rostlin (viz výsledky). Jelikož pěstební podmínky byly pro obě varianty stejné (a to včetně stejné dávky hnojiv do na živiny chudého substrátu) je nutné tyto rozdíly vysvětlovat přítomností arbuskulárně mykorhizních hub, respektive symbiózou jako takovou, kterou jsem ověřil několika způsoby (viz výsledky).

6.1. Změny v expresi fosfátových transportérů jsou zodpovědné za vyšší koncentraci fosforu v M+ rostlinách

Fungující mutualistická, arbuskulárně mykorhizní symbióza je odhalitelná i na transkripční úrovni. Hlavním genem ukazující tuto funkčnost je u *Medicago truncatula* čtvrtý fosfátový transportér (MtPT4; viz současné vědění), který byl v NM rostlinách neexprimovaný a u M+ rostlin zapnutý s velmi silnou expresí v řádu statisíců mRNA pro PT4 na ng ribonukleových kyselin (RNA) (viz výsledky). Zároveň tyto M+ rostliny snížily expresi všech ostatních fosfátových transportérů (viz výsledky), což potvrzuje teorii dvou cest příjmu fosfátů rostlinou – přímé cesty a mykorhizní cesty (viz současné vědění). Zapnutí mykorhizní cesty vedlo v tomto experimentu k téměř dvojnásobnému zásobení rostliny fosforem oproti NM kontrole, což ukazuje na důležitost této symbiózy pro luxusní život tolíce v relativně chudých půdních podmínkách. Dále to poukazuje na fakt, že by v takto funkčním vztahu měl být v provozu i tok látek opačný, tj. tok cukrů z rostliny do houby, což je hlavním zájmem této diplomové práce.

Z hlediska důležitosti fosfátových transportérů pro distribuci fosfátu v rostlině mi přijdou zajímavé výsledky expresních profilů fosfátových transportérů v prýtu. Koncentrace fosforu v prýtu M+ rostlin je průkazně navýšena v 6 časových bodech (neprůkazně ve všech 7), ale aktivita fosfátových transportérů je potlačena obecně (až na výše zmíněný PT4, který ale v prýtu vykazuje expresi slabou a ne rozdílnou od NM rostlin), tudíž se nabízí otázka, jakými transportéry (jakou cestou) je fosfát distribuován z buněk primární kůry kořene s arbuskulemi – což je zdroj fosfátu při mykorhizní cestě příjmu – do vodivých pletiv a následně do prýtu. V základu jsou dvě možnosti: 1.) rostlině postačují tyto expresní profily pro efektivní distribuci fosfátu v rostlině a zejména do prýtu; 2.) fosfát není do prýtu transportován těmito fosfátovými transportéry a/ nebo je transportován v jiné formě než ve volném fosfátovém aniontu. Z první možnosti by bylo nutné ověřit, zda postačuje aktivita exprimovaných fosfátových transportérů (na první pohled vypadají PT5 a PT6 odpovědné za nakládání fosfátů do xylému, jelikož v kořeni jsem prokázal jejich expresi), zda je PT4 lokalizován pouze v periarbuskulární membráně a také jak transportu jako takovému napomáhá zvýšená koncentrace fosfátu. Dle expresních profilů těchto transportérů v transkriptomickém atlasu MtGEA jsou PT5 a PT6 jedinými fosfátovými transportéry exprimovanými i v prýtu (viz obrázky), což ale nevysvětluje odtok fosfátů z kořene. Druhá možnost není tak pravděpodobná, jelikož mi není známo, že by rostliny transportovaly fosfát v jiné formě na tak dlouhou (respektive složitou) vzdálenost, jakou cesta kořen-prýt je, ve formě fosforylovaných uhlovodíků (např. fosfolipidů) či jiné. Zůstává tak možnost využití jiných proteinů schopných transportovat fosfát přes membránu, tedy buď prozatím neobjevených fosfátových

transportérů, fosfátových kanálů či transportérů pro jiný substrát, který je schopen transportovat i fosfát (především za vyšší koncentrace).

6.2. Vyšší zásobení rostlin dusíkem je způsobeno vyšší aktivitou nitrifikačních bakterií.

Díky analýzám na hmotnostním spektrometru jsem měl možnost porovnat i koncentraci a obsah dusíku v těchto rostlinách. Přestože rozdíl není tak dramatický, M⁺ rostliny byly lépe živeny i co se týče dusíku. Jelikož obě varianty byly inokulovány také kompatibilním kmenem hlízkovité bakterie *Synorhizobium meliloti*, která je schopná asimilovat vzdušný dusík a zásobit tak rostlinu dusíkem v půdě nepřítomným, je nutné prodiskutovat i tuto možnost. Leghemoglobinem narůžovělé hlízky na kořenech tolic byly při sklizni patrné (nekvantifikováno) a exprese genů *S. meliloti* byla zřetelná na mikroarrayových čípech, kde jsou přítomny i próby pro většinu bakteriálních genů *S. meliloti* (data neuvedena). Samotná přítomnost této symbiózy však nepostačuje k hodnověrnému tvrzení, že za vyšší zásobení M⁺ rostlin dusíkem jsou rhizobia zodpovědná. Jelikož tato data nejsou široce ověřená, nemůžu dělat silné závěry. Vysvětlení poodhalené naší laboratoří (Püschel a kol., 2017) však nabízí elegantní řešení: zvýšené zásobení M⁺ rostlin fosforem lépe zásobí i bakteriální symbionty, které jsou tímto lepším zásobením fosforem stimulovány a více fixují vzdušný dusík. Příčinou vyšší koncentrace dusíku v M⁺ rostlinách by tak byla vyšší koncentrace fosforu v M⁺ rostlinách. Otevřené však musejí být i možnosti zvýšeného zásobení dusíkem mykorhizní houbou, ke kterému také dochází (viz současné poznání). Tuto hádanku by mohlo vyřešit zapojení stabilního izotopu dusíku ¹⁵N do experimentu, což ale bohužel nebylo provedeno.

Dalším dílkem do skládky podporující lepší zásobení bakteriálních symbiontů u M⁺ rostlin je vyšší exprese genu kódující polyol / monosacharidový přenašeč (ST6) po 35 dnech. Dle MtGEA je jeho exprese lokalizována téměř výhradně do nodulí, tudíž lze předpokládat jeho účast na transportu sacharidů do nodule či z nodule bakteriím. Transportovaným sacharidem může být glukóza, fruktóza nebo polyoly, jichž umí *S. meliloti* zpracovávat široké spektrum (Martinez de Drets a Arias, 1970; Gardiol a kol., 1980). Přebytek fruktózy v kolonizovaných kořenech může být přesměrován do jiných jímajících orgánů (Casieri a kol. 2013). Mykorhizní rostliny by si tím pádem mohly dovolit více investovat do hlízek zejména ve fázi prvotní kolonizace a vegetativního růstu, z čehož by profi až do druhé sklizně G2, kde je exprese ST6 srovnatelná mezi M⁺ a NM rostlinami (přesto ho M⁺ rostliny exprimují signifi více), a sklizně T, kde byl obsah dusíku analyzován. Nemykorhizní rostliny silně navyšují expresi ST6 ve třetí sklizni G3, kde – ač to nebylo okem patrné – mohly měnit svůj metabolismus ve prospěch nastávajícímu období květu a budoucímu ukládání zásobních proteinů v semeni, tudíž počaly více zásobovat rhizobia až v pozdější fázi.

Bez bližší analýzy pohybu dusíku, lokalizace exprimovaného proteinu ST6 a charakterizace jeho substrátové specifi je to celé pouhou domněnkou. Z fyziologického hlediska by postačovalo určit, zda je tento transportér důležitý pro výživu nodulí, například vyřazením tohoto genu RNA interferencí a sledování toků izotopu uhlíku ¹³C včetně bližší analýzy charakteristik nodulí na rostlině. Takovýto experiment by ale mohl zkomplikovat fakt, že *S. meliloti* umí zužitkovávat velké spektrum sacharidů, tudíž je možné, že vyřazení jedné transportní dráhy neovlivní zásobování tohoto užitečného symbionta.

6.3. Přítomnost AM houby je patrná na zvýšené podzemní respiraci a AM houba zvyšuje fotosyntetickou fixaci, nejspíše díky posílení jímající kapacity kořene

Arbuskulárně mykorhizní houby jsou biotrofně závislé heterotrofové, tzn. veškerou energii (cukry, uhlík) přijímají od rostliny a v podzemí ji spotřebovávají – spalují. Heterotrofně se chovají i podzemní, nezelené části rostlin, tj. kořeny a hlízky. Při katabolismu uhlíkatých látek dochází

k uvolňování CO_2 . Ten může být v rostlině rozpuštěn a transportován do prýtu, kde může být opětovně asimilován, nebo může volně difundovat do půdy. Zvýšení podzemní respirace (viz výsledky) tak přisuzují přítomnosti houbového symbionta, který substrát prorůstá, či metabolické aktivitě kořene samotného. Respirace skutečně bývá v M+ kořenech vyšší než v NM kořenech (Shachar-Hill a kol., 1995; Douds a kol., 2000). Zajímavý je fakt, že tato zvýšená respirace je průkazně navýšena pouze v prvních 3 dnech ze 4, pak se rozdíl smazává. Jelikož stabilní izotop ^{13}C , kterým byly rostliny označeny, byl v podzemní respiraci průkazně navýšen v prvním dni po značení (viz výsledky), byly čerstvě vyrobené asimiláty transportovány, předány a prodýchány relativně v krátkém čase. To zvýrazňuje důležitost toku asimilátů floémem.

C3 rostliny fixují lépe při zvýšené koncentraci CO_2 . Koncentrace CO_2 ve značící komoře se pohybovala v rozmezí 547–613 ppm (data neuvedena), koncentrace však byla stejná pro obě varianty (byly značeny současně ve stejné komoře). M+ rostliny tudíž byly schopné zužitkovat a odčerpat zvýšený přísun asimilátů, takže fotosyntetické procesy netrpěly zpětnou inhibicí substrátem. Jednou z možností, jak se rostliny mohly vypořádat s větším množstvím asimilátů, aniž by působily inhibičně, je navýšení syntézy přechodného, listového škrobu. Tento jev byl pozorován například u rýže (Ono a kol., 2003). Průkazné navýšení ^{13}C v prýtu však bylo odhaleno u M+ rostlin (viz výsledky), tudíž do vysvětlení tohoto fenoménu musíme zapojit mykorhizu, což by nám zároveň odpovídalo na fakt, že došlo i k navýšení podzemní respirace. Fotochemické procesy a výměna CO_2 jsou významně navýšeny v M+ rajčeti (kultivaru MoneyMaker) v reakci na kolonizaci AM houbou *G. mossae* (při stejné absorbanci je maximální výnos z fotosystému II dramaticky navýšen, využití excitační energie je efektivnější a dochází k vychýlení frakcí otevřených PSII, přestože je snížen obsah chlorofylu) (Boldt a kol., 2011).

Transgenní přístupy u bramboru (Zhang a kol., 2008) ukazují, že zvýšení jímající schopnosti kořene (respektive stonkové hlízy) – v těchto případech navýšením transportu cukrů do amyloplastů a následné syntézy škrobu – je možné docílit vyšších výnosů. Jelikož tolerance pravděpodobně nenavýšily ukládání cukrů v kořeni ve formě škrobu, ale ony či AM houby ho prodýchaly, na samotném faktu zvýšení jímající schopnosti podzemních částí (posílení sinku) a z toho plynoucího navýšení fotosyntetické aktivity to nic nemění. Jednou z možností by mohlo být zvýšení exprese genů zodpovědných za zásobování heterotrofních plastidů – genů ze stejných skupin, jaké využívají Zhang a kol., 2008 a Jonik a kol., 2012. Jednou z možných sinků je pak zvýšená poptávka po zvýšené syntéze lipidů a membrán (Gaude a kol., 2012) – viz níže. K posílení jímající schopnosti kořene by mohlo dojít efektivnějším nakládáním asimilátů do floému, jelikož je předpokládáno těsné propojení draselných a cukerných toků během nakládání do floému – vnější proud draselných kationtů plně kompenzuje depolarizaci (Gieger, 2011) – a obsah sodných iontů, které většinou negativně interagují s funkcí iontů draselných, je v M+ prýtu snížen (Garcia a kol., 2017).

6.4. Expresa GPT1 je zodpovědná za vyšší metabolickou aktivitu kořenových plastidů

Vybraný gen **ST5** (GPT1) vykazuje mykorhizně specifické navýšení exprese (viz výsledky). Tento protein je zodpovědný za zásobování heterotrofních plastidů uhlíkovým skeletem (glukóza-6-fosfátem, G-6-P), což u bramboru spolu s navýšením exprese genu pro NTT vede k posílení syntézy škrobu, ale pokud je posílen pouze jeden gen z této dvojice, k efektivnímu navýšení syntézy škrobu nedochází (Zhang a kol., 2008). U tolerance je nepravděpodobné, že by tímto způsobem navýšila syntézu zásobního škrobu v kořenech, obzvlášť, když je kolonizovaná biotrofním symbiontem. Zbývají tak dvě hlavní možnosti metabolického využití tohoto navýšeného importu G-6-P do plastidu, které se mohou vzájemně doplňovat.

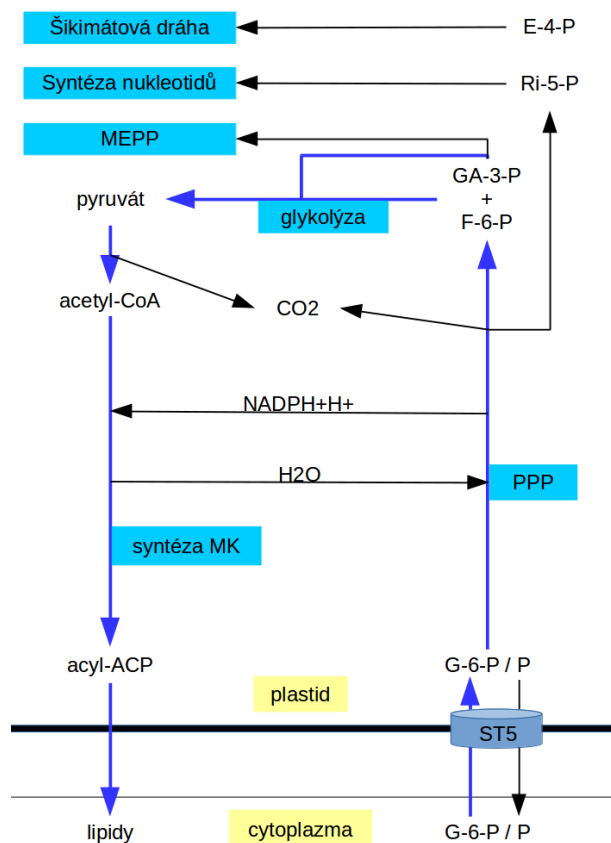
Mykorhizní rostliny mají zvýšený nárok na syntézu mastných kyselin *de novo* (**neolipogeneze**) (Gomez a kol., 2009; Gaude a kol., 2012a; Hogeekamp a Küster, 2013), která probíhá výhradně v plastidech a v základu generuje kyselinu palmitovou (16:0) a kys. olejovou (18:1). Patrně je to

způsobeno velkým pohybem váčků nejenom pro ukojení zvýšené poptávky po membránách jako takových, které rostoucí arbuskule a tudíž vznikající periarbuskulární membrána nutně vyžaduje. Tento proces růstu arbuskule musí být úzce koordinován s růstem periarbuskulární membrány, neboť nesoulad těchto procesů by mohlo vést k prasknutí buňky. Dále nesmíme zapomínat ani na možnost, že lipidy jsou jednou možnou formou uhlíku předávané z rostliny do houby, což by favorizovalo syntézu kys. palmitové (Bravo a kol., 2017). Tuto hypotézu dále podporuje objevené zapnutí genu pro glycerol-3-fosfát acyltransferázu (data neuvedena).

Druhým metabolickým dějem, který by mohl zužitkovávat G-6-P, je **pentózo-fosfátová dráha** (pentose-phosphate pathway, PPP), která produkuje redukční ekvivalenty NADPH použitelné právě při neolipogenezi či redukci antioxidačních látek (glutathionu). Tuto hypotézu by podporovalo posílení exprese proteinů vázajících NADP (NADP-binding rossmann fold proteins; data neuvedena), které ale nejsou blíže anotované. Následná neoxidativní část produkuje různorodé uhlíkové skelety, zejména ribóza-5-fosfát (R-5-P) využitelný pro syntézu nukleotidů a nukleových kyselin, erytróza-4-fosfát (E-4-P) využitelný pro syntézu aromatických aminokyselin (fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu) či glyceralddehyd-3-fosfát (GA-3-P) využitelný v alternativní dráze syntézy izoprenoidů (na mevalonové kyselině nezávislé dráze, tj. **methylethylerythritol-fosfátové dráze**, 2-C-methylethylerythritol 4-phosphate pathway, MEPP). Nutno zmínit, že produktů využitelných pro další anabolické dráhy je vícero, tudíž se hodí vypíchnout i možnou syntézu fytohormonů: z aminokyselin tryptofanu mohou vznikat auxiny (které ale primárně v kořeni nevznikají, nicméně lokální účinek během mykorrhizy prozkoumán není), ze syntézy izoprenoidů může vznikat kyselina abscisová (z karotenoidů), cytokininy (z adenosinu a hemiterpenu DMAPP), gibbereliny (z hemiterpenu MEP), strigolaktony (z karotenoidů), potenciálně i brassinosteroidy (z kampesterolu), salicylové kyseliny (z fenylalaninu), jasmonáty (z linolenové kyseliny, 18:3), apokarotenoidy či triacantanol (z kys. melissilové?, 30:0) – o izoprenoidních sekundárních metabolitech např. Strack a kol., 2003. Tyto dráhy, respektive produkty, však nemají vždy dokonale objasněné fungování, včetně jinak relativně známého fytohormonu brassinosteroidu. Lokální maxima a rychlé obraty látek jsou nad rámec pozorovacích schopností, tudíž je důležité se v souvislosti s AMS podívat na popisované hormonální výkyvy, mj. osvětlených i studiemi na mutantách.

Nehledě na konkrétní formu spotřeby G-6-P, navýšená exprese transportéru tohoto substrátu

Schéma 6.4.: Schéma znázorňující propojenost metabolických drah v plastidu buňky s arbuskulí. Stechiometrie reakcí není upravena. Glukóza-6-fosfát (G-6-P) je importován přes vnitřní plastidovou membránu transportérem GPT1 (ST5) a vstupuje do pentózo-fosfátové dráhy (PPP). Produktem PPP jsou zejména uhlíkové skelety erytróza-4-fosfát (E-4-P), ribóza-5-P (Ri-5-P), fruktóza-6-P (F-6-P) a glyceralddehyd-3-P (GA-3-P), dále CO₂ a NADPH+H⁺. GA-3-P a F-6-P vstupují do glykolýzy (popř. methylethylerythritol-fosfátové dráhy, MEPP), jejíž produktem je pyruvát, NAD(P)H a ATP. Pyruvát je za spotřeby ATP přeměněn na acetyl-CoA, který vstupuje do syntézy mastných kyselin (MK). Vzniklá mastná kyselina (acyl-ACP) je využita pro tvorbu membránových lipidů či jinak (viz diskuze). Hlavní cesty obarveny modře.



ukazuje na zvýšenou metabolickou aktivitu plastidů v kořeni. Nejpravděpodobnější formou spotřeby je nejspíše neolipogeneze a s tím spojená tvorba redukčních ekvivalentů v pentóza-fosfátové dráze, jelikož syntéza sekundárních metabolitů (včetně fytohormonů) nebude vzhledem k nízkým aktivním koncentracím těchto látek tím hlavním spotřebitelem. Přehledně to ukazuje schéma 6.4.

6.5. Na⁺/urea symportér je zodpovědný za remobilizaci dusíku v mykorhizních kořenech

Tento protein (ST7) je velkým oříškem a jeho počáteční anotace jako symportér Na⁺ a solutu (tedy víceméně jakékoliv rozpuštěné látky včetně sacharidu) způsobila zařazení tohoto genu do užšího výběru. Dalším pátráním však byla objevena i anotace jakožto blízce příbuzného AtDUR3, což je symportér Na⁺ a močoviny (Liu a kol., 2003).

Přestože byly hypotézy, že transportní formou dusíku z AM houby do rostliny je močovina, v současnosti je tato možnost spíše opuštěna. Zejména navyšování exprese přenašeče amoniaku MtAMT1 v buňkách s arbuskulí podporuje hypotézu, že přenášenou formou z periarbuskulárního prostoru do rostlinné buňky je NH₄⁺. Je možné, že močovina vznikající z houbového argininu není lokalizována v houbové hyfě, ale v periarbuskulárním prostoru a až tam uvolňuje amoniak. Houbové geny pro transportéry amoniaku jsou však také vysoce exprimované ve vnitrokořenovém myceliu (Jin a kol., 2012), přesto je otázkou, zda jsou zodpovědné za export NH₃ z AM houby a ne pouze za import (ve zpětné resorbci uniklého NH₃ či v případě příliš vysoké koncentrace; Calabrese a kol., 2016) – tak jako tak, přenašeč močoviny kódovaný rostlinou ztrácí v tomto ohledu význam.

Na grafech dvou prób pro ST7 z databáze MtGEA (viz výsledky) lze vidět, že ST7 je exprimován rozdílně v různých vzorcích stejného typu. U huseníčku slouží DUR3 při remobilizaci dusíku ze senescentních listů (Bohner a kol., 2015), tudíž se pro jeho „zubatou“ expresi v MtGEA nabízí obdobné vysvětlení: ST7 transportuje močovinu zejména z odumírajících buněk kořene. Přestože jsou arbuskule hlavní strukturou zodpovědnou za mutualistický a funkční charakter symbiózy, jsou efemerními strukturami (Bonfante-Fasolo, 1984). V takové situaci si lze představit přítomnost močoviny ve větším množství než v běžném periarbuskulárním prostoru a za takové situace by mohl být ST7 účasten přenosu. Společně s tímto samozřejmě zůstává otevřená možnost účasti ST7 na remobilizaci dusíku v rámci rostlinných pletiv.

V prýtu je expresní hladina ST7 relativně nízká, ale také prýty nebyly nikterak stresovány a tudíž listy příliš neodumíraly. Exprese tak může být „naředěna“ zdravými buňkami, jelikož byl analyzován celý prýt. I tak došlo u M⁺ rostlin k významnému snížení exprese! Jednou z možností by mohlo být fakt, že mykorhizní tolíce má v prýtu téměř poloviční obsah Na⁺ (Garcia a kol., 2017), který je potřeba pro funkčnost symportéru ST7. Naopak v kořeni, kde je přítomna AM houba, lze očekávat změněné koncentrace sodných iontů a minimálně vzniklý gradient, jelikož houby obsahují vysoké koncentrace sodných iontů (Cromack a kol., 1977). V případě uvolnění buněčného obsahu arbuskule by tak byl import Na⁺ a močoviny vysoce energeticky výhodný. Exprese ST7 je ale tak jako tak spíše nízká, tudíž neočekávám, že by tento mechanismus byl vysoce důležitý, a ani nejsem schopen ho obhájit oproti klasickému využití tohoto genu samotnou rostlinou (které není prozkoumáno), jelikož je ST7 exprimován i v NM rostlinách.

6.6. Některé geny exprimované i v NM rostlině reagují na vznik nového sinku

Pět genů – ST1, ST2, ST4, ST8 a Ref1 – jsou exprimovány i v nemykorhizních rostlinách, ale v přítomnosti mykorhizního symbionta svou expresí mění. Relativně vysoký počet kopií mRNA pro tyto geny dává napovědět, že nepochází (pouze) z buněk s arbuskulí, ale budou

exprimovány i v kořenových buňkách bez arbuskule, což podporují i expresní profi z databáze MtGEA. Nejslaběji na AMS reaguje SWEET3c (**ST1**), u kterého bylo při pohledu na mikročipová data otázkou, zda je jeho exprese posílena, zeslabena či zůstává stejná. Přesnější qRT-PCR data ukazují, že exprese v M+ kořenech není statisticky odlišná (až na poslední časový bod), je ale jedním z mála genů, které vykazují slušnou expresi v prýtech a zde je dokonce průkazné snížení exprese u M+ rostlin ve dvou časových bodech. Jeho důležitost tak při AMS klesá či je zastoupena jinými geny. To je však v rozporu s výsledky na bramboru, u kterého byla exprese StSWEET3 naopak navýšena v M+ kořenech v jednom ze dvou časových bodech (Manck-Götzenberger a Requena, 2016), a u rýže v M+ kořenech (Fiorilli a kol., 2015). Sameeullah a kol. (2016) popisují, že *in silico* hledáním vychází 3 geny pro SWEET se zvýšenou expresí během AMS (MtSWEET1b, 3c a 12 a OsSWEET1b, 3b a 12; u bramboru pro změnu StSWEET1a, 1b, 7a a 12a, ale pátráním v MtGEA jim autoři predikují jako příbuzné geny MtSWEET1b, 6 a 9b (Manck-Götzenberger a Requena, 2016)) a že obsahují promotorové motivy (MYCS, PB1S a PHR1) důležité pro ustanovení AMS. Mé výsledky by favorizovaly MtSWEET1b (viz níže), ale s MtSWEET3c bohužel nemohu souhlasit. Je však možné, že vzhledem k velkému zmnožení genů SWEET3 u *M. truncatula* (MtSWEET3a, 3b a 3c; viz fylogenetický strom SWEET) byly navržené primery špatné, respektive mohly zaznamenávat expresi i jiných genů, a to těch nejvíce podobných, tj. MtSWEET3a a / nebo 3b. V případě, že Fiorilli a kol. provedli bioinformatickou analýzu špatně, jsou mé výsledky ohledně MtSWEET3c ve shodě s doposavad učiněnými objevy. Vyloučit také nelze, že MtSWEET3c reaguje více na fyziologické podmínky než na AMS samotnou.

Hexózový transportér Mtst1 nebo MtHEX1 (**ST2**) je mykorhizními výzkumníky znám již delší dobu. První indukce mykorhizou byla popsána již v roce 1996 (Harrison, 1996) a v transkriptomických analýzách se objevuje i později. *In situ* hybridizace v NM kořenech lokalizovala transkripty pro Mtst1 do primárních svazků floému uvnitř centrálního válce a v kořenové špičce ihned za meristém do elongační zóny, v M+ kořenech byl transkript lokalizovatelný navíc i v kortikální buňkách kořene kolonizovaného AM houbou, jak v buňkách s arbuskulí, tak v buňkách bez arbuskule sousedících s houbovou hyfou (Harrison, 1996). Expresní profil v MtGEA však tento fakt nepodporuje a ukazuje nejvyšší expresi v hlízkách. Navýšení exprese v hlízkách byla objevena i u homologního přenašeče v cizně (*Cicer arietinum*), autoři však neměli k dispozici mykorhizní variantu (Alfonso-Grunz a kol., 2014). Má data však potvrzují vysoké navýšení exprese ST2 u M+ rostlin, tudíž podporují výsledky Marie J. Harrison. Tyto pozorování dělají z Mtst1 kandidáta na transportér související se sinkem jako takovým. Jelikož není exprimován striktně v buňkách s arbuskulí, je pravděpodobné, že je zodpovědný za vstřebávání hexóz z apoplastu na plasmatické membráně, čímž posiluje transport sacharidů do buněk s přímou spotřebou. Takovou roli mu přiřazují např. Gaude a kol. (2012b).

Další monosacharidový přenašeč je řazen mezi tonoplastové monosacharidové transportéry (TMT) a nese anotaci TMT2, kterou ale sdílí s dalšími tolicovými TMT. V mém experimentu nese označení **ST4** a vykazuje snížení exprese při AMS. Je typickým příkladem komplikovanosti skupiny monosacharidových přenašečů, jelikož kromě glukózy může přenášet i disacharid sacharózu (Schulz a kol., 2011). Fungoval by pak ve spolupráci se sacharidovým přenašečem ze 4. skupiny, tedy např. s MtSUT4-1 (Doidy a kol., 2012). SUT4-1 by pak byl zodpovědný za mobilizaci vakuolárních zásob sacharózy symportem s H⁺, kdežto TMT by do vakuoly nakládal glukózu i sacharózu výměnou za H⁺. Tato antiportová aktivita je úzce spřažená se správnými gradienty glukózy a pH, přičemž – jak ukazují transportní charakteristiky mutantů a overexpresorů AtTMT1/2 v mezofylových vakuolách huseníčku – množství proteinu pozitivně koreluje s přenosovou aktivitou (Schulz a kol., 2011). Umělé navýšení exprese AtTMT1 také vedlo k fyziologickým účinkům: rostliny více ukládaly cukerné zásoby a méně asimilátů prodýchaly, což vedlo k lepšímu vzrůstu huseníčků a k větším semenům (Wingenter a kol., 2010). Tito autoři také popisují, že AtSUC2 zodpovědný za nakládání sacharózy do fl je inhibován cytosolicou glukózou, tudíž vyšší exprese a aktivita TMT1 zároveň podporuje export asimilátů z listu,

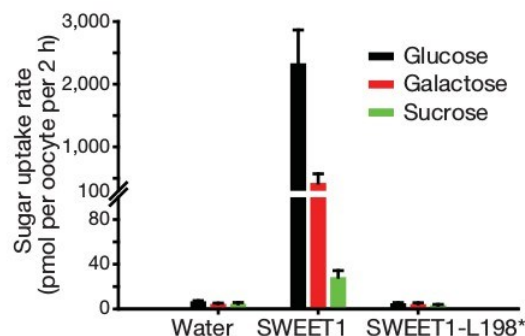
tj. posiluje zdroj, nejspíše díky změně cukerné vnitrobuněčné lokalizace a změněnému vnímání cukerných hladin v buňce. Samotné snížení exprese u M+ rostlin by tedy odpovídalo zvýšené hladině glukózy v cytoplazmě. Nutno podotknout, že v prvním časovém bodě je exprese ST4 sice trochu, ale průkazně navýšena v M+ prýtu, což by znamenalo posílení exportu asimilátů do fl

Zajímavá je podobnost křivek exprese **ST4** a **Ref1** v prýtu i v kořeni. Mohlo by to znamenat, že transkripční iniciační faktor 2f alfa (Ref1) je zodpovědný za iniciaci transkripce ST4, případně stejnou regulaci obou těchto genů. Bylo by zajímavé zjistit, na jaké podněty reagují tyto geny, respektive tento faktor, protože vykazují vyšší expresi (a tedy i důležitost) v NM rostlinách. Druhý referenční gen **Ref2** vykázal vyšší expresi v NM prýtech ve druhém časovém bodě, ale statisticky na hraně průkaznosti, jinak byly jeho expresní hodnoty podobné v M+ i NM rostlinách, tudíž svou úlohu referenčního genu splnil za těchto experimentálních podmínek mnohem lépe.

Posledním genem z pěti těchto genů je glykosyl transferáza (**ST8**), což je jediný blíže prozkoumaný gen, který není transportérem. Tento gen je anotován jako UDP-glukosyl transferáza, ale vzhledem k velkému množství těchto enzymů v genomu rostlin (i *M. truncatula*) je nutné brát tuto *in silico* predikci s rezervou. Glykosyl transferázy vytváří glykosidické vazby a fungují tak v opozici s glykosyl hydrolázami, které tyto vazby štípou. Výsledkem této činnosti může být vznik disacharidu, oligosacharidu i polysacharidu včetně glykosidů (molekul s necukernými zbytky navázanými glykosidickou vazbou). Kromě vzniku strukturních sacharidů je důležitá funkce těchto enzymů pro správnou glykosylaci proteinů. Zajímavá je podobnost exprese s ST5, na rozdíl od kterého však ST8 vykazuje vysokou expresi i v NM kořenech. Pokud se chytíme hypotézy, že navýšení exprese ST5 jde ruku v ruce zvýšené syntéze lipidů (viz výše), pak by navýšení exprese glykosyl transferázy nabízelo vysvětlení v glykosylaci lipidů. Buněčná stěna v symbiotickém rozhraní je však velice odlišná od běžné buněčné stěny rostlinné buňky, glykosyl transferáza tak může hrát roli pouze v této nestandardní buněčné struktuře (Balestrini a Bonfante, 2014). Toto „glykosylační pole“ je natolik rozlehle a neprobádané, že je bohužel ST8 slepou uličkou této práce.

6.7. Tři geny mohou být přímo zodpovědné za přenos cukrů na periarbuskulární membráně

Pasivní přenašeč cukrů – SWEET1b (**ST3**) – byl v experimentu téměř „zapnut“ při AMS, což ukazuje na jeho velkou důležitost ve fungování symbiocy. Samuelah a kol. (2016) objevili indukci rýžového OsSWEET1b v M+ rýži, pravděpodobný homolog StSWEET1b v bramboru je vysoce exprimován v hlíze, okvětních lístcích a během AMS (Manck-Götzenberger a Requena, 2016) a jejich pátrání v databázi MtGEA potvrzuje indukci MtSWEET1b arbuskulárně mykorrhizní symbiózou. Jak lze vidět na grafu exprese próby pro MtSWEET1b z MtGEA (viz výsledky), jeho exprese narůstá při AMS, v nodulech a v semeni. Všechny tyto tři orgány mají rozdílný genotyp a tudíž nejsou propojeny symplasticky. Tyto výsledky tak ukazují na úlohu SWEET1b pro apoplastické vykládání. Problémem však je, že AtSWEET1 přenáší glukózu, méně pak galaktózu, ale sacharózu téměř vůbec (viz obr. 6.7.) a tudíž lze předpokládat stejnou substrátovou specifitu i pro MtSWEET1b. Zároveň schopnost přenášet glukózu má být charakteristická pro první klad proteinů SWEET. Současné dogma však předpokládá, že rostlina vykládá sacharózu, která je štěpena apoplastickou invertázou a houba vstřebává uvolněné monosacharidy. Do tohoto konceptu SWEET1 jako exportní přenašeč nezapadá. Výsledky tak spíše podporují vznik mo-

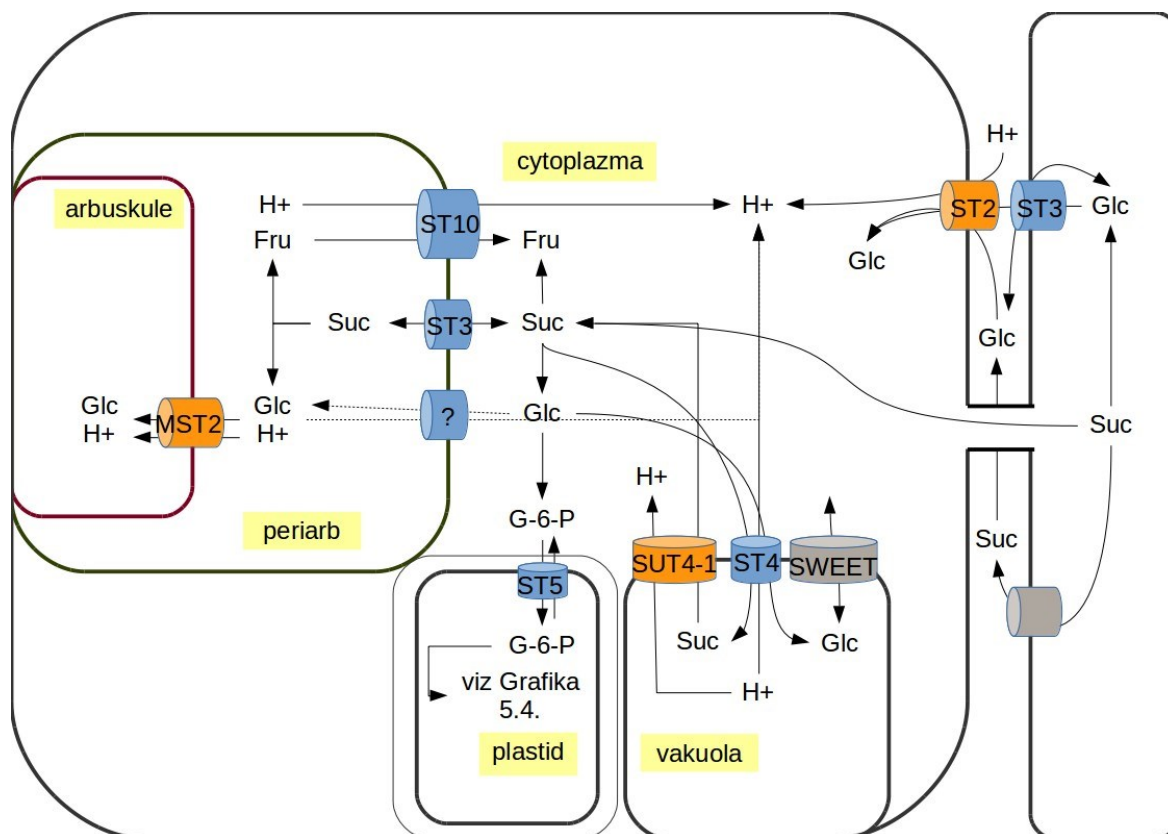


Obr. 6.7.: Substrátová specifita AtSWEET1. Převzato od Chen a kol., 2010.

nosacharidů již v cytoplazmě a jejich výtok do periarbuskulárního prostoru, odkud jsou okamžitě vstřebávány houbou prostřednictvím vysokoafinitního přenašeče MST2 (schematicky viz Grafika 6.7.). V modelaci buněčného rozhraní *in silico* Schott a kol. (2016) prokazují, že jsou koncentrace látek (cukru a fosfátu) v periarbuskulárním prostoru velmi nízké, v mikromolární a nižší koncentraci, během transportní rovnováhy. Pokud bude na periarbuskulární membráně pasivní přenašeč typu SWEET, cokoliv bude exportováno, bude okamžitě importováno houbovým vysokoafinitním přenašečem MST2. Rostlina tak musí regulovat export cukrů buď aktivitou (tj. i množstvím) transportérů SWEET1 na periarbuskulární membráně nebo množstvím hexóz v cytoplazmě, které mohou pasivním přenašečem vytékat.

ST9 jsem za pomoci tří predikčních platforem (HMMTOP, CCTOP a PredictProtein) určil jako membránový protein s 12 transmembránovými helixy, tedy transportér z rodiny MFS. Je proto možné, že přenáší sacharidy. Bohužel v programu CCTOP nebyla dostupná predikce 3D struktury a některé predikční programy zobrazené programem CCTOP k porovnání vypočítaly menší počet transmembránových helixů. Program PredictProtein predikuje jeho lokalizaci do endoplazmatického retikula. Nutná je proto jeho bližší charakterizace. Před samotným prozkoumáním jeho struktury *in silico* či krystalograficky by bylo vhodné zjistit jeho transportní aktivitu, např. expresí v kvasince či oocyty. Gen je to nesmírně zajímavý, jelikož vykazuje striktně M⁺ kořenovou expresi, jenže o něm nelze nic zjistit. Analýza pomocí srovnávacího programu BLAST navíc ukazuje, že nejpodobnější proteiny jsou opět necharakterizované proteiny (data neuvedena). Nejlepšího skóre dosahují neznámé proteiny z čeledi bobovitých (*Fabaceae*), tj. nejbližších příbuzných *M. truncatula*, další „zásahy“ jsou zejména v čeledi lilkovitých (*Solanaceae*), dále u eukalyptu (*Eucalyptus*), sezamu (*Sesamum*), kávovníku (*Coffea*), cicimku (*Ziziphus*), povijnice (*Ipomoeae*), révy (*Vitis*) či bavlníku (*Gossypium*). Anotovaný protein s nejvyšším skóre je podjednotka proteinové kinázy z kakovníku (*Theobroma cacao*) (5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-3, putative). V nemykorhizní čeledi nemykorhizní čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) však nelze objevit žádný podobný protein! Není proto divu, že předpokládám jeho velkou roli při funkci AMS, kterou ale nemohu více podložit.

Přenašeč polyolů a/nebo monosacharidů (PMT) **ST10** je dle MtGEA exprimován zejména při suchu v kořeni i prýtu a nejvíce v obalu semene. Ve vzorcích, ve kterých je exprimován MtPT4 (červené čáry v grafech z MtGEA), není ST10 téměř vůbec exprimován, tudíž mé výsledky jsou víceméně protichůdné, jelikož v M⁺ kořeni tohoto experimentu vykazuje pozitivní expresní aktivitu. V prýtu je také exprimován, ale výsledky nejsou rozdílné (až na třetí časový bod), tudíž bych předpokládal jakousi připravenost prýtu na nutnost osmotické regulace zapomocí rozpustných sacharidů. AtPMT1 a AtPMT2 transportují fruktózu a xylitol společně s H⁺ a jsou lokalizovány na plazmatické membráně expandujících heterotrofních buněk pylu, pylové láčky, mladých buněk xylému a hydatodách, kde mohou importovat fruktózu z apoplastického štěpení sacharózy (Klepek a kol., 2010). Dle programu BLAST vykazuje ST10 vysokou podobnost 56 % s oběma AtPMT1 i 2, oproti ST6, u kterého je identita pouze 46 %. ST10 je tak kandidátem na zpětné vstřebávání fruktózy na periarbuskulární membráně. Relativně nízká, avšak specifická exprese v M⁺ kořeni by mohla postačovat k efektivnímu vybírání fruktózy z periarbuskulárního prostoru vzniklé štěpením sacharózy apoplastickými invertázami, jelikož malé množství transportérů stačí k efektivní změně koncentrace látek v periarbuskulárním prostoru (Schott a kol. 2016).



Grafika 6.7.: Schéma znázorňující možné zapojení vybraných genů v transportu buňky primární kůry s arbuskulí. Modře predikované transportéry, oranžově potvrzené transportéry, šedivě nekonkretizované transportéry. Sacharóza ze zdrojové buňky (vpravo) přichází buď symplasticky nebo po hydrolýze jako glukóza apoplasticky přes minimálně dva transportéry. Do periarbuskulárního prostoru (periarb) je sacharóza (či jiný sacharid) přenášena doposavad neznámým transportérem.

7. Závěr

Experimentální práce snažící se prověřit změnu cukerného metabolismu v symbiotickém vztahu mezi rostlinou a arbuskulárně mykorhizní houbou splnila své vytyčené cíle v rámci použitých metod a časovému období věnovanému tomuto experimentu. Na modelových organismech totiž *Medicago truncatula*, nitrifikační bakterie *Sinorhizobium meliloti* a arbuskulárně mykorhizní houbě *Rhizophagus irregularis* jsem poodhalil dění na molekulární úrovni co se sacharidů týče. Pěstované rostliny *M. truncatula* se v designu pokusu lišily pouze v jednom faktoru a byly či nebyly inokulovány arbuskulárně mykorhizní houbou, tj. porovnával jsem dvě varianty. Mykorhizní symbiont však ovlivnil fyziologii rostlin v několika charakteristikách a některé z nich jsem prozkoumal molekulárními metodami.

Pěstební podmínky zahrnující na živiny chudý substrát a hnojení živným roztokem se sníženým obsahem fosforu zajistily mutualistický vztah mezi rostlinou a houbou a rostliny nevykázaly pozitivní ani negativní změnu růstové odpovědi v průběhu 64 dní růstu rostlin, jelikož jejich suchá biomasa byla srovnatelná – tím byl splněn první hlavní cíl. Experiment ale nezahrnoval celý ontogenetický cyklus *M. truncatula* a tudíž nelze vyhodnotit růstovou odpověď rostlin na arbuskulárně mykorhizní symbiózu co se týče jejich reprodukce. V dalších parametrech jsem rozdíl mezi variantami zaznamenal, jelikož mykorhizní rostliny měly větší obsah fosforu a dusíku v sušině. Dále mykorhizní rostliny lépe asimilovaly oxid uhličitý, což jsem prověřil pomocí značení stabilním izotopem v oxidu uhličitém $^{13}\text{CO}_2$ – prýty mykorhizních rostlin obsahovaly větší množství tohoto izotopu. Zlepšení fotosyntetických vlastností přikládám posílení sinku díky biotrofní mykorhizní houbě, jelikož podzemní kompartment (substrát s kořeny, rhizobiemi a houbou) respiroval průkazně více a stabilní izotop ^{13}C byl více obsažen ve vyrespirovaném CO_2 z podzemního kompartmentu u mykorhizních rostlin než u nemykorhizních rostlin. Tímto jsem prověřil změny v tocích uhlíku u mykorhizních rostlin, což byl další hlavní cíl.

Hlavní částí této práce je transkriptomická analýza genů *M. truncatula* porovnáním mykorhizních a nemykorhizních variant po 5, 7 a 9 týdnech růstu. Změny v obsahu fosforu v sušině rostlin jsem diskutoval s výsledky z qRT-PCR měření exprese šesti fosfátových transportérů. Dle výsledků došlo ke změně přímé cesty příjmu fosforu na mykorhizní cestu, protože mykorhizně specifický gen MtPT4 byl u mykorhizních rostlin zapnut a ostatní fosfátové transportéry svou expresí snížily. To ukazuje na funkční ustanovení symbiózy, tudíž lze očekávat změny v expresi genů účastnících se předávání sacharidů (uhlíku) z rostliny do houby. Díky mikročipové analýze celého transkriptomu jsem mohl vybrat 10 genů, které se této metabolické změny mohou účastnit, a prověřit změny jejich exprese pomocí qRT-PCR. Tento hlavní cíl byl splněn úspěšně, avšak bližší charakterizace těchto genů byla složitější. V pátrání po transportérech přímo se účastnících toku uhlíku z rostliny do houby jsem byl metodicky omezen na vlastní expresní data, záznamy ve veřejných databázích a literární rešerši. Přestože tak nemohu plně potvrdit, který či které transportéry se tohoto toku účastní, vytipoval jsem několik kandidátů a navrhuji jejich úlohu v metabolismu a transportu rostliny během funkční arbuskulárně mykorhizní symbiózy. Pro potvrzení či vyvrácení role těchto kandidátních genů na výživě houbového symbionta je potřeba prozkoumat jejich nezbytnost pro tuto symbiózu, například vyřazením těchto genů za pomoci mutagenese či RNA interference, a jejich roli při změnách environmentálních podmínkách, zejména při abiotických stresech, rozdílné dostupnosti živin, stínění a kompetici mezi rostlinami. Doufám proto, že mé přispění do současného vědění o arbuskulárně mykorhizní symbióze pomůže dalším výzkumníkům bádajících v tomto vědeckém oboru.

8.Reference

Abramson J, Smirnova I, Kasho V, Verner G, Kaback HR, Iwata S (2003).
Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*.
Science 301 (5633): 610-615.

Afonso-Grunz F, Molina C, Hoffmeier K, Rycak L, Kudapa H, Varshney RK, Drevon JJ, Winter P, Kahl G (2014).
Genome-based analysis of the transcriptome from mature chickpea root nodules.
Frontiers in Plant Science. DOI: 10.3389/fpls.2014.00325

Asher CJ, Ozanne PG (1967).
Growth and potassium content of plants in solution cultures maintained at constant potassium concentrations.
Soil Science 103 (3): 155-161.

Atkins C, Ruan Y-L (2016).
Plants in Action, Chapter 5 - Phloem transport.
Australian Society of Plant Scientists, New Zealand Society of Plant Biologists, and New Zealand Institute of Agricultural and Horticultural Science 2010, 2016. <http://plantsinaction.science.uq.edu.au>

Ayre BG (2011).
Membrane-transport systems for sucrose in relation to whole-plant carbon partitioning.
Mol Plant 4 (3): 377-94. DOI: 10.1093/mp/ssr014.

Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y (2000).
Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas.
Plant Physiol 124 (3): 949-58.

Balestrini R, Bonfante P (2014).
Cell wall remodeling in mycorrhizal symbiosis: a way towards biotrophism.
Frontiers in Plant Science 5: 237. DOI: 10.3389/fpls.2014.00237.

Bapaume L, Reinhardt D (2012).
How membranes shape plant symbioses: signaling and transport in nodulation and arbuscular mycorrhiza.
Front Plant Sci 3: 223. DOI: 10.3389/fpls.2012.00223.

Barea JM, Jeffries P (1995).
Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plant systems.
Hock B, Varma A (Editors): *Mycorrhiza structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer, Heidelberg; 521, 559. ISBN 978-3-662-03779-9.

Baslam M, Esteban R, García-Plazaola JI, Goicoechea N (2013).
Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of major carotenoids, chlorophylls and tocopherol in green and red leaf lettuces.
Appl Microbiol Biotechnol 97 (7): 3119-3128. DOI: 10.1007/s00253-012-4526-x.

- Bethlenfalvay GJ, Schüßler H (1994).
Arbuscular mycorrhizas and agrosystem stability.
Gianinazzi S & Schüßler H (Editors): Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. Springer, Basel AG; 117, Äd'131. ISBN: 978-3-0348-9654-2.
- Bitterlich M, Krügel U, Boldt-Burisch K, Franken P, Kuhn C (2014).
Interaction of brassinosteroid functions and sucrose transporter SISUT2 regulate the formation of arbuscular mycorrhiza.
Plant Signal Behav 9 (10). DOI: 10.4161/15592316.2014.970426.
- Blee KA, Anderson AJ (2002).
Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose synthase accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules.
Plant Mol Biol. 50 (2): 197-211.
- Bohner A, Kojima S, Hajirezaei M, Melzer M, von Wirén N (2015).
Urea retranslocation from senescing Arabidopsis leaves is promoted by DUR3-mediated urea retrieval from leaf apoplast.
The Plant Journal. 81 (3): 377-387. DOI: 10.1111/tpj.12740.
- Boldt K, Pörs Y, Haupt B, Bitterlich M, Kuhn C, Grimm B, Franken P (2011).
Photochemical processes, carbon assimilation and RNA accumulation of sucrose transporter genes in tomato arbuscular mycorrhiza.
J Plant Physiol. 168 (11): 1256-1263. DOI: 10.1016/j.jplph.2011.01.026.
- Bonfante P, Anca IA (2009).
Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions.
Annu Rev Microbiol. 63: 363-383. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073504.
- Bonfante-Fasolo P (1984).
Anatomy and morphology of VA mycorrhizae.
In: C.L. Powell, D.J. Bagyaraj (Eds.) VA Mycorrhizae. CRC Press, Boca Raton: 5, Äd'33. ISBN: 9780849356940.
- Bouche-Pillon S, Fleurat-Lessard P, Fromont JC, Serrano R, Bonnemain JL (1994).
Immunolocalization of the Plasma Membrane H⁺-ATPase in Minor Veins of Vicia faba in Relation to Phloem Loading.
Plant Physiol. 105 (2): 691-697.
- Bravo A, Brands M, Wewer V, Dörmann P, Harrison MJ (2017).
Arbuscular mycorrhiza-specific enzymes FatM and RAM2 fine-tune lipid biosynthesis to promote development of arbuscular mycorrhiza.
New Phytol. DOI: 10.1111/nph.14533.
- Burkle L, Hibberd JM, Quick WP, Kuhn C, Hirner B, Frommer WB (1998).
The H⁺-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves.
Plant Physiol. 118 (1): 59-68.

Calabrese S, Pérez-Tienda J, Ellerbeck M, Arnould C, Chatagnier O, Boller T, Schüßler A, Brachmann A, Wipf D, Ferrol N, Courty PE (2016).

GintAMT3, A Low-Affinity Ammonium Transporter of the Arbuscular Mycorrhizal *Rhizophagus irregularis*.

Frontiers in Plant Science. 7: 679. DOI: 10.3389/fpls.2016.00679.

Cannon SB, Ilut D, Farmer AD, Maki SL, May GD, Singer SR, Doyle JJ (2010).

Polyploidy did not predate the evolution of nodulation in all legumes.

PLoS One. 5 (7). DOI: 10.1371/journal.pone.0011630.

Cappellazzo G, Lanfranco L, Fitz M, Wipf D, Bonfante P (2008).

Characterization of an amino acid permease from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*.

Plant Physiol. 147 (1): 429-437. DOI: 10.1104/pp.108.117820.

Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J, Hedrich R (2005).

Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force.

J Biol Chem. 280 (22): 21437-21443.

Casieri L, Ait Lahmidi N, Doidy J, Veneault-Fourrey C, Migeon A, Bonneau L, Courty PE,

Garcia K, Charbonnier M, Delteil A, Brun A, Zimmermann S, Plassard C, Wipf D (2013).

Biotrophic transportome in mutualistic plant-fungal interactions.

Mycorrhiza. 23 (8): 597-625. DOI: 10.1007/s00572-013-0496-9.

Cohn M, Bart RS, Shybut M, Dahlbeck D, Gomez M, Morbitzer R, Hou BH, Frommer WB, Lahaye T, Staskawicz BJ (2014).

Xanthomonas axonopodis virulence is promoted by a transcription activator-like effector-mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava.

Mol Plant Microbe Interact. 27 (11): 1186-1198. DOI: 10.1094/MPMI-06-14-0161-R.

Cook DR (1999).

Medicago truncatula--a model in the making!

Curr Opin Plant Biol. 2 (4): 301-304.

Couillerot O, Ramírez-Trujillo A, Walker V, von Felten A, Jansa J, Maurhofer M, Delfago G, Prigent-Combaret C, Comte G, Caballero-Mellado J, Moënne-Loccoz Y (2013).

Comparison of prominent *Azospirillum* strains in *Azospirillum*-*Pseudomonas*-*Glomus* consortia for promotion of maize growth.

Appl Microbiol Biotechnol. 97 (10): 4639-4649. DOI: 10.1007/s00253-012-4249-z.

Cromack K, Sollins P, Todd RL, Crossley Jr DA, Fender WM, Fogel R, Todd AW (1977).

Soil Microorganism, Arthropod Interactions: Fungi as Major Calcium and Sodium Sources.

In: Mattson W.J. (eds) The Role of Arthropods in Forest Ecosystems. Proceedings in Life Sciences. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-88448-1.

Cruz C, Egsgaard H, Trujillo C, Ambus P, Requena N, Martins-Loução MA, Jakobsen I (2007).

Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi.

Plant Physiol. 144 (2): 782-792.

- De Schepper V, De Swaef T, Bauweraerts I, Steppe K (2013).
Phloem transport: a review of mechanisms and controls.
J Exp Bot. 64 (16): 4839-4850. DOI:10.1093/jxb/ert302.
- Deng D, Xu C, Sun P, Wu J, Yan C, Hu M, Yan N (2014).
Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1.
Nature. 510 (7503): 121-125. DOI: 10.1038/nature13306.
- DeWitt ND, Sussman MR (1995).
Immunocytological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H(+)-ATPase) in phloem companion cells.
Plant Cell. 7 (12): 2053-2067.
- Dobson L, Remenyi I, Tusnady GE (2015).
CCTOP: a Consensus Constrained TOPology prediction web server.
Nucleic Acids Res. 43 (W1): W408-412. DOI: 10.1093/nar/gkv451.
- Doidy J, van Tuinen D, Lamotte O, Corneillat M, Alcaraz G, Wipf D (2012).
The *Medicago truncatula* sucrose transporter family: characterization and implication of key members in carbon partitioning towards arbuscular mycorrhizal fungi.
Mol Plant. 5 (6): 1346-1358. DOI: 10.1093/mp/sss079.
- Douds DD, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y (2000).
Carbon partitioning, cost and metabolism of arbuscular mycorrhizae in arbuscular mycorrhizas: physiology and function.
In Y Kapulnick, DD Douds Jr, eds, *Arbuscular Mycorrhizas: Molecular Biology and Physiology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. ISBN: 07923 6444 9.
- Dyson BC, Webster RE, Johnson GN (2014).
GPT2: a glucose 6-phosphate/phosphate translocator with a novel role in the regulation of sugar signalling during seedling development.
Ann Bot. 113 (4): 643-652. DOI: 10.1093/aob/mct298.
- Eicks M, Maurino V, Knappe S, Flügge UI, Fischer K (2002).
The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants.
Plant Physiol. 128 (2): 512-522.
- Eom JS, Chen LQ, Sosso D, Julius BT, Lin IW, Qu XQ, Braun DM, Frommer WB (2015).
SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation.
Curr Opin Plant Biol. 25: 53-62. DOI: 10.1016/j.pbi.2015.04.005.
- Estrada B, Aroca R, Maathuis FJ, Barea JM, Ruiz-Lozano JM (2013).
Arbuscular mycorrhizal fungi native from a Mediterranean saline area enhance maize tolerance to salinity through improved ion homeostasis.
Plant Cell Environ. 36 (10): 1771-1782. DOI: 10.1111/pce.12082.
- FAO (2009).
How to Feed the World in 2050.
Food and Agriculture Organization of the United Nations - High Level Expert Forum: http://www.fao.org/world_in_2050.pdf

Fellbaum CR, Gachomo EW, Beesetty Y, Choudhari S, Strahan GD, Pfeffer PE, Kiers ET, Bücking H (2012).

Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis.

Proc Natl Acad Sci U S A. 109 (7): 2666-2671. DOI: 10.1073/pnas.1118650109.

Fiorilli V, Vallino M, Biselli C, Faccio A, Bagnaresi P, Bonfante P (2015).

Host and non-host roots in rice: cellular and molecular approaches reveal differential responses to arbuscular mycorrhizal fungi.

Front Plant Sci. 6: 636. DOI: 10.3389/fpls.2015.00636.

Fischer K, Kammerer B, Gutensohn M, Arbingner B, Weber A, Häusler RE, Flügge UI (1997). A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter.

Plant Cell. 9 (3): 453-462.

Flügge UI (1999).

Phosphate translocators in plastids.

Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 50: 27-45.

Flügge UI, Häusler RE, Ludewig F, Gierth M (2011).

The role of transporters in supplying energy to plant plastids.

J Exp Bot. 62 (7): 2381-2392. DOI: 10.1093/jxb/erq361.

Frame J (2005).

Medicago truncatula Gaertn.

Grassland Species Profiles, Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/gbase/data/meditrunc.htm>

Garcia K, Zimmermann SD (2014).

The role of mycorrhizal associations in plant potassium nutrition.

Front Plant Sci. 5: 337. DOI: 10.3389/fpls.2014.00337.

Garcia K, Chasman D, Roy S, Ané JM (2017).

Physiological Responses and Gene Co-Expression Network of Mycorrhizal Roots under K(+) Deprivation.

Plant Physiol. 173 (3): 1811-1823. DOI: 10.1104/pp.16.01959.

Gardiol A, Arias A, Cerveñansky C, Gaggero C, Martínez-Drets G (1980).

Biochemical characterization of a fructokinase mutant of *Rhizobium meliloti*.

Journal of Bacteriology. 144 (1): 12-16.

Gaude N, Bortfeld S, Duensing N, Lohse M, Krajinski F (2012a).

Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development.

Plant J. 69 (3): 510-528. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2011.04810.x.

Gaude N, Schulze WX, Franken P, Krajinski F (2012b).

Cell type-specific protein and transcription profiles implicate periarbuscular membrane synthesis as an important carbon sink in the mycorrhizal symbiosis.

Plant Signal Behav. 7 (4): 461-464. DOI: 10.4161/psb.19650.

- Gaude N, Bortfeld S, Erban A, Kopka J, Krajinski F (2015).
Symbiosis dependent accumulation of primary metabolites in arbuscule-containing cells.
BMC Plant Biology. 15: 234. DOI: 10.1186/s12870-015-0601-7.
- Geiger D (2011).
Plant sucrose transporters from a biophysical point of view.
Mol Plant. 4 (3): 395-406. DOI: 10.1093/mp/ssr029.
- Gianinazzi S, Gollotte A, Binet MN, van Tuinen D, Redecker D, Wipf D (2010).
Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services.
Mycorrhiza. 20 (8): 519-530. DOI: 10.1007/s00572-010-0333-3.
- Giaquinta RT (1979).
Phloem loading of sucrose: involvement of membrane ATPase and proton transport.
Plant Physiol. 63 (4): 744-748.
- Giovannetti M, Mosse B (1980).
An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots.
New Phytologist, 84: 489-500. DOI:10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x.
- Gomez SK, Javot H, Deewatthanawong P, Torres-Jerez I, Tang Y, Blancaflor EB, Udvardi MK, Harrison MJ (2009).
Medicago truncatula and Glomus intraradices gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis.
BMC Plant Biol. 9: 10. DOI: 10.1186/1471-2229-9-10.
- Gottwald JR, Krysan PJ, Young JC, Evert RF, Sussman MR (2000).
Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters.
Proc Natl Acad Sci U S A. 97 (25): 13979-13984.
- Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin H, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Blücking H, Lammers PJ, Shachar-Hill Y (2005).
Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis.
Nature. 435 (7043): 819-823.
- Griffiths CA, Paul MJ, Foyer CH (2016).
Metabolite transport and associated sugar signalling systems underpinning source/sink interactions.
Biochim Biophys Acta. 1857 (10): 1715-1725. DOI: 10.1016/j.bbabi.2016.07.007.
- Guether M, Neuhäuser B, Balestrini R, Dynowski M, Ludewig U, Bonfante P (2009).
A mycorrhizal-specific ammonium transporter from Lotus japonicus acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi.
Plant Physiol. 150 (1): 73-83. DOI: 10.1104/pp.109.136390.
- Guo WJ, Nagy R, Chen HY, Pfrunder S, Yu YC, Santelia D, Frommer WB, Martinoia E (2014).
SWEET17, a facilitative transporter, mediates fructose transport across the tonoplast of Arabidopsis roots and leaves.
Plant Physiol. 164 (2): 777-789. DOI: 10.1104/pp.113.232751.

- Harrison MJ (1996).
A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations.
Plant J. 9 (4): 491-503.
- Harrison MJ, Dewbre GR, Liu J (2002).
A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi.
Plant Cell. 14 (10): 2413-2429.
- Hedrich R, Sauer N, Neuhaus HE (2015).
Sugar transport across the plant vacuolar membrane: nature and regulation of carrier proteins.
Curr Opin Plant Biol. 25: 63-70. DOI: 10.1016/j.pbi.2015.04.008.
- Helber N, Wippel K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B, Requena N (2011).
A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants.
Plant Cell. 23 (10): 3812-3823. DOI: 10.1105/tpc.111.089813.
- Heldt HW (1969).
Adenine nucleotide translocation in spinach chloroplasts.
FEBS Lett. 5 (1): 11-14.
- Hewitt EJ, Smith TA (1975).
Plant Mineral Nutrition.
Hodder & Stoughton, London. ISBN: 0340184981.
- Hodge A, Campbell CD, Fitter AH (2001).
An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material.
Nature. 413 (6853): 297-299.
- Hogekamp C, Arndt D, Pereira PA, Becker JD, Hohnjec N, K \ddot{u} ster H (2011).
Laser microdissection unravels cell-type-specific transcription in arbuscular mycorrhizal roots, including CAAT-box transcription factor gene expression correlating with fungal contact and spread.
Plant Physiol. 157 (4): 2023-2043. DOI: 10.1104/pp.111.186635.
- Hogekamp C, K \ddot{u} ster H (2013).
A roadmap of cell-type specific gene expression during sequential stages of the arbuscular mycorrhiza symbiosis.
BMC Genomics. 14: 306. DOI: 10.1186/1471-2164-14-306.
- Hohnjec N, Perlick AM, P \ddot{u} hler A, K \ddot{u} ster H (2003).
The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene MtSucS1 is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi.
Mol Plant Microbe Interact. 16 (10): 903-915.
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P (2008).
Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes.
Adv Bioinformatics. 2008: 420747. DOI: 10.1155/2008/420747.

- Hruz T, Wyss M, Docquier M, Pfaffl MW, Masanetz S, Borghi L, Verbrugghe P, Kalaydjieva L, Bleuler S, Laule O, Descombes P, Gruissem W, Zimmermann P (2011). RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC Genomics*. 12: 156. DOI: 10.1186/1471-2164-12-156.
- Hu Y, Zhang J, Jia H, Sosso D, Li T, Frommer WB, Yang B, White FF, Wang N, Jones JB (2014). Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111 (4): E521-529. DOI: 10.1073/pnas.1313271111.
- Huang Y, Lemieux MJ, Song J, Auer M, Wang DN (2003). Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science*. 301 (5633): 616-620.
- Chalot M, Blaudez D, Brun A (2006). Ammonia: a candidate for nitrogen transfer at the mycorrhizal interface. *Trends Plant Sci*. 11 (6): 263-266.
- Chardon F, Bedu M, Calenge F, Klemens PA, Spinner L, Clement G, Chietera G, L[√]©ran S, Ferrand M, Lacombe B, Loudet O, Dinant S, Bellini C, Neuhaus HE, Daniel-Vedele F, Krapp A (2013). Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Curr Biol*. 23 (8): 697-702. DOI: 10.1016/j.cub.2013.03.021.
- Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, Guo WJ, Kim JG, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB, Frommer WB (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*. 468 (7323): 527-532. DOI: 10.1038/nature09606.
- Chen LQ, Qu XQ, Hou BH, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB (2012). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science*. 335 (6065): 207-211. DOI: 10.1126/science.1213351.
- Chen LQ (2014). SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytol*. 201 (4): 1150-1155.
- Cheng L, Booker FL, Tu C, Burkey KO, Zhou L, Shew HD, Rufty TW, Hu S (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi increase organic carbon decomposition under elevated CO₂. *Science*. 337 (6098): 1084-1087. DOI: 10.1126/science.1224304.
- Chong J, Piron MC, Meyer S, Merdinoglu D, Bertsch C, Mestre P (2014). The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *J Exp Bot*. 65 (22): 6589-6601. DOI: 10.1093/jxb/eru375.
- Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison MJ (2007). A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104 (5): 1720-1725.

- Jin H, Liu J, Liu J, Huang X (2012).
Forms of nitrogen uptake, translocation, and transfer via arbuscular mycorrhizal fungi: a review.
Sci China Life Sci. 55 (6): 474-482. DOI: 10.1007/s11427-012-4330-y.
- Jonik C, Sonnewald U, Hajirezaei MR, Flügge UI, Ludewig F (2012).
Simultaneous boosting of source and sink capacities doubles tuber starch yield of potato plants.
Plant Biotechnol J. 10 (9): 1088-1098. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2012.00736.x.
- Jung B, Ludewig F, Schulz A, Meißner G, Wöstefeld N, Flügge UI, Pommerrenig B, Wirsching P, Sauer N, Koch W, Sommer F, Mählhaus T, Schroda M, Cuin TA, Graus D, Marten I, Hedrich R, Neuhaus HE (2015).
Identification of the transporter responsible for sucrose accumulation in sugar beet taproots.
Nat Plants. 1: 14001. DOI: 10.1038/nplants.2014.1.
- Kaldorf M, Schmelzer E, Bothe H (1998).
Expression of maize and fungal nitrate reductase genes in arbuscular mycorrhiza.
Mol Plant Microbe Interact. 11 (6): 439-448.
- Kammerer B, Fischer K, Hilpert B, Schubert S, Gutensohn M, Weber A, Flügge UI (1998).
Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter.
Plant Cell. 10 (1): 105-117.
- Klepek YS, Volke M, Konrad KR, Wippel K, Hoth S, Hedrich R, Sauer N (2009).
Arabidopsis thaliana POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTERS 1 and 2: fructose and xylitol/H⁺ symporters in pollen and young xylem cells.
Journal of Experimental Botany. 61 (2): 537-550. DOI: 10.1093/jxb/erp322.
- Koske RE, Gemma JN (1989).
A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas.
Mycological Re 92(4): 486-505.
- Krügler U, Veenhoff LM, Langbein J, Wiederhold E, Liesche J, Friedrich T, Grimm B, Martinoia E, Poolman B, Kühn C (2008).
Transport and sorting of the solanum tuberosum sucrose transporter SUT1 is affected by posttranslational modification.
Plant Cell. 20 (9): 2497-2513. DOI: 10.1105/tpc.108.058271.
- Krügler U, Wiederhold E, Pustogowa J, Hackel A, Grimm B, Kühn C (2013).
Site directed mutagenesis of StSUT1 reveals target amino acids of regulation and stability.
Biochimie. 95 (11): 2132-2144. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.07.028.
- Kumar H, Kasho V, Smirnova I, Finer-Moore JS, Kaback HR, Stroud RM (2014).
Structure of sugar-bound LacY.
Proc Natl Acad Sci U S A. 111 (5): 1784-1788. DOI: 10.1073/pnas.1324141111.
- Kunz HH, Hüsler RE, Fettke J, Herbst K, Niewiadomski P, Gierth M, Bell K, Steup M, Flügge UI, Schneider A (2010).
The role of plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocators in vegetative tissues of Arabidopsis thaliana mutants impaired in starch biosynthesis.
Plant Biol (Stuttg). 12 Suppl 1:115-128. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2010.00349.x.

Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM (1999).
The dual function of sugar carriers. Transport and sugar sensing
Plant Cell. 11 (4): 707-726.

Leifheit EF, Verbruggen E, Rillig MC (2015).
Arbuscular mycorrhizal fungi reduce decomposition of woody plant litter while increasing soil
aggregation.
Soil Biol. Biochem. 81: 323-328.

Liu LH, Ludewig U, Frommer WB, von Wirlich N (2003).
AtDUR3 Encodes a New Type of High-Affinity Urea/H⁺ Symporter in Arabidopsis.
The Plant Cell. 15 (3): 790-800. DOI: 10.1105/tpc.007120.

Lobo AK, de Oliveira Martins M, Lima Neto MC, Machado EC, Ribeiro RV, Silveira JA (2015).
Exogenous sucrose supply changes sugar metabolism and reduces photosynthesis of sugarcane
through the down-regulation of Rubisco abundance and activity.
J Plant Physiol. 179: 113-121. DOI: 10.1016/j.jplph.2015.03.007.

López-Pedrosa A, González-Guerrero M, Valderas A, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2006).
GintAMT1 encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the
extraradical mycelium of Glomus intraradices.
Fungal Genet Biol. 43 (2): 102-110.

Ludwig A, Stolz J, Sauer N (2000).
Plant sucrose-H⁺ symporters mediate the transport of vitamin H.
Plant J. 24 (4): 503-509.

Maiden MC, Davis EO, Baldwin SA, Moore DC, Henderson PJ (1987).
Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous.
Nature. 325 (6105): 641-643.

Manck-Götzenberger J, Requena N (2016).
Arbuscular mycorrhiza Symbiosis Induces a Major Transcriptional Reprogramming of the Potato
SWEET Sugar Transporter Family.
Front Plant Sci. 7: 487. DOI: 10.3389/fpls.2016.00487.

Martinez De Drets G, Arias A (1970).
Metabolism of some polyols by Rhizobium meliloti.
J Bacteriol. 103 (1): 97-103.

Mathimaran N, Ruh R, Vullioud P, Frossard E, Jansa J (2005).
Glomus intraradices dominates arbuscular mycorrhizal communities in a heavy textured
agricultural soil.
Mycorrhiza 16 (1): 61-66.

Moody PW, Bell MJ (2006).
Availability of soil potassium and diagnostic soil tests.
Soil Res 44: 265-275.

Moorby J, Jarman PD (1975).
The use of compartmental analysis in the study of the movement of carbon through leaves.
Planta 122 (2): 155-168. DOI: 10.1007/BF00388655.

- Neuhaus HE, Thom E, M^uhlmann T, Steup M, Kampfenkel K (1997).
Characterization of a novel eukaryotic ATP/ADP translocator located in the plastid envelope of *Arabidopsis thaliana* L.
Plant J. 11 (1): 73-82.
- Ohno T, Zibilske LM (1991).
Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using malachite green.
Soil Sci Soc Am J 55: 892-895. DOI: 10.2136/sssaj1991.03615995005500030046x.
- Oliveira RS, Rocha I, Ma Y, Vos^otka M, Freitas H (2016).
Seed coating with arbuscular mycorrhizal fungi as an ecotechnological approach for sustainable agricultural production of common wheat (*Triticum aestivum* L.).
J Toxicol Environ Health A. 79 (7): 329-337. DOI: 10.1080/15287394.2016.1153448.
- Olsson PA, Thingstrup I, Jakobsen I, Baath E (1999).
Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field.
Soil Biol. Biochem. 31: 1879-1887.
- Ortu G, Balestrini R, Pereira PA, Becker JD, K^uster H, Bonfante P (2012).
Plant genes related to gibberellin biosynthesis and signaling are differentially regulated during the early stages of AM fungal interactions.
Mol Plant. 5 (4): 951-954. DOI: 10.1093/mp/sss027.
- Parker JL, Newstead S (2014).
Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1.1.
Nature 507 (7490): 68-72. DOI: 10.1038/nature13116.
- Patrick JW, Offler CE (1996).
Post-sieve element transport of photoassimilates in sink regions.
J Exp Bot. 47 Spec No: 1165-1177. DOI: 10.1093/jxb/47.Special_Issue.1165.
- Paul MJ, Pellny TK (2003).
Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development.
J Exp Bot. 54 (382): 539-547.
- Pedersen BP, Kumar H, Waight AB, Risenmay AJ, Roe-Zurz Z, Chau BH, Schlessinger A, Bonomi M, Harries W, Sali A, Johri AK, Stroud RM (2013).
Crystal structure of a eukaryotic phosphate transporter.
Nature 496 (7446): 533-536. DOI: 10.1038/nature12042.
- Perner H, Schwarz D, Bruns C, M^ussler P, George E (2007).
Effect of arbuscular mycorrhizal colonization and two levels of compost supply on nutrient uptake and flowering of pelargonium plants.
Mycorrhiza 17 (5): 469-474.
- Pfeffer PE, Douds Jr DD, Becard G, Shachar-Hill Y (1999).
Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza.
Plant Physiol. 120 (2): 587-598.

- Pfeil BE, Schlueter JA, Shoemaker RC, Doyle JJ (2005).
Placing paleopolyploidy in relation to taxon divergence: a phylogenetic analysis in legumes using 39 gene families.
Syst Biol. 54 (3): 441-454.
- Porras-Soriano A, Soriano-Martínez ML, Porras-Piedra A, Azcón R (2009).
Arbuscular mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake and tolerance to salinity in olive trees under nursery conditions.
J Plant Physiol. 166 (13): 1350-1359. DOI: 10.1016/j.jplph.2009.02.010.
- Puntervoll P, Linding R, Gemünd C, Chabanis-Davidson S, Matningsdal M, Cameron S, Martin DM, Ausiello G, Brannetti B, Costantini A, Ferrer F, Maselli V, Via A, Cesareni G, Diella F, Superti-Furga G, Wyrwicz L, Ramu C, McGuigan C, Gudavalli R, Letunic I, Bork P, Rychlewski L, Küster B, Helmer-Citterich M, Hunter WN, Aasland R, Gibson TJ (2003).
ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins.
Nucleic Acids Res. 31 (13): 3625-3630.
- Pöschel D, Janoušková M, Voňková A, Gryndlerová H, Vořtka M, Jansa J (2017).
Arbuscular Mycorrhiza Stimulates Biological Nitrogen Fixation in Two *Medicago* spp. through Improved Phosphorus Acquisition.
Front Plant Sci. 8: 390. DOI: 10.3389/fpls.2017.00390.
- Reinders A, Sivitz AB, Starker CG, Gantt JS, Ward JM (2008).
Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*.
Plant Mol Biol. 68 (3): 289-299. DOI: 10.1007/s11103-008-9370-0.
- Reiser J, Linka N, Lemke L, Jeblick W, Neuhaus HE (2004).
Molecular physiological analysis of the two plastidic ATP/ADP transporters from *Arabidopsis*.
Plant Physiol. 136 (3): 3524-3536.
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H (1994).
Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae.
Proc Natl Acad Sci U S A. 91 (25): 11841-11843.
- Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB (1994).
Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning.
EMBO J. 13 (1): 1-7.
- Rillig MC (2004).
Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes.
Ecology Letters 7: 740-754.
- Rose RJ (2008).
Medicago truncatula as a model for understanding plant interactions with other organisms, plant development and stress biology: past, present and future.
Functional Plant Biology 35: 253-264. DOI: 10.1071/FP07297.

- Ruan Y-L, Patrick JW (1995).
The cellular pathway of postphloem sugar transport in developing tomato fruit.
Planta 196: 434-444.
- Ruuska SA, Girke T, Benning C, Ohlrogge JB (2002).
Contrapuntal networks of gene expression during Arabidopsis seed filling.
Plant Cell 14 (6): 1191-1206.
- Štěpánek V, Konvalinková T, Jansa J (2017).
Carbon Fluxes in Mycorrhizal Plants.
Mycorrhiza, A Function, Diversity, State of the Art. Springer, Switzerland. ISBN 978-3-319-53064-2.
- Sameeullah M, Demiral T, Aslam N, Baloch FS, Gurel E (2016).
In Silico Functional Analyses of SWEETs Reveal Cues for Their Role in AMF Symbiosis.
Plant, Soil and Microbes Volume 2: Mechanisms and Molecular Interactions, Springer. ISBN: 978-3-319-29572-5.
- Schaarschmidt S, Roitsch T, Hause B (2006).
Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots.
J Exp Bot. 57 (15): 4015-4023.
- Schaarschmidt S, González MC, Roitsch T, Strack D, Sonnewald U, Hause B (2007).
Regulation of arbuscular mycorrhization by carbon. The symbiotic interaction cannot be improved by increased carbon availability accomplished by root-specifically enhanced invertase activity.
Plant Physiol. 143 (4): 1827-1840.
- Schaarschmidt S, Hause B (2008).
Apoplastic invertases: Multi-faced players in the arbuscular mycorrhization.
Plant Signal Behav. 3 (5): 317-319.
- Scheloske S, Maetz M, Schneider T, Hildebrandt U, Bothe H, Pöhl B (2004).
Element distribution in mycorrhizal and nonmycorrhizal roots of the halophyte *Aster tripolium* determined by proton induced X-ray emission.
Protoplasma 223 (2-4): 183-189.
- Schott S, Valdebenito B, Bustos D, Gomez-Porras JL, Sharma T, Dreyer I (2016).
Cooperation through Competition, A Dynamics and Microeconomics of a Minimal Nutrient Trade System in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis.
Frontiers in Plant Science 7: 912. DOI: 10.3389/fpls.2016.00912.
- Schulten H-R, Schnitzer M (1997).
Chemical Model Structures for Soil Organic Matter and Soils.
Soil Science 162 (2): 115-130.
- Schulz A, Beyhl D, Marten I, Wormit A, Neuhaus E, Poschet G, Böttner M, Schneider S, Sauer N, Hedrich R (2011).
Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2.
Plant J. 68 (1): 129-136. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2011.04672.x.

- Schunemann D, Borchert S, Flugge UI, Heldt HW (1993).
ADP/ATP Translocator from Pea Root Plastids (Comparison with Translocators from Spinach Chloroplasts and Pea Leaf Mitochondria).
Plant Physiol. 103 (1): 131-137.
- Schulze A, Martin H, Cohen D, Fitz M, Wipf D (2006).
Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi.
Nature 444 (7121): 933-936.
- Shachar-Hill Y, Pfeffer PE, Douds D, Osman SF, Doner LW, Ratcliffe RG (1995).
Partitioning of Intermediary Carbon Metabolism in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Leek.
Plant Physiol. 108 (1): 7-15.
- Sirko A, Brodzik R (2000).
Plant ureases: roles and regulation.
Acta Biochim Pol. 47 (4): 1189-1195.
- Slavíková R, Píschel D, Janoušková M, Hujšlová M, Konvalinková T, Gryndlerová H, Gryndler M, Weiser M, Jansa J (2017).
Monitoring CO₂ emissions to gain a dynamic view of carbon allocation to arbuscular mycorrhizal fungi.
Mycorrhiza 27 (1): 35-51. DOI: 10.1007/s00572-016-0731-2.
- Smith GS, Johnston CM, Cornforth IS (1983).
Comparison of nutrient solutions for growth of plants in sand culture.
New Phytol 94: 537-548.
- Smith SE, Smith FA (2012).
Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth.
Mycologia 104 (1): 1-13. DOI: 10.3852/11-229.
- Staehr P, Lüttge T, Christmann A, Krueger S, Rosar C, Rolčík J, Novák O, Strnad M, Bell K, Weber AP, Flugge UI, Hüsler RE (2014).
Reticulate leaves and stunted roots are independent phenotypes pointing at opposite roles of the phosphoenolpyruvate/phosphate translocator defective in *cuel* in the plastids of both organs.
Front Plant Sci. 5: 126. DOI: 10.3389/fpls.2014.00126.
- Stockinger H, Walker C, Schulze A (2009).
,*Glomus intraradices* DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*.
New Phytol. 183 (4): 1176-1187. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02874.x.
- Strack D, Fester T, Hause B, Schliemann W, Walter MH (2003).
Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects.
J Chem Ecol. 29 (9): 1955-1979.
- Streubel J, Pesce C, Hutin M, Koebnik R, Boch J, Szurek B (2013).
Five phylogenetically close rice SWEET genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.
New Phytol. 200 (3): 808-819. DOI: 10.1111/nph.12411.

Suelter CH (1985).

Role of Potassium in Enzyme Catalysis.

Potassium in Agriculture. DOI:10.2134/1985.potassium.c13

Sun J, Bankston JR, Payandeh J, Hinds TR, Zagotta WN, Zheng N (2014).

Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter NRT1.1.

Nature 507 (7490): 73-77. DOI: 10.1038/nature13074.

Tang H, Krishnakumar V, Bidwell S, Rosen B, Chan A, Zhou S, Gentzbittel L, Childs KL, Yandell M, Gundlach H, Mayer KFX, Schwartz DC, Town CD (2013).

An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicago truncatula*.

BMC Genomics 15: 312. DOI: 10.1186/1471-2164-15-312.

Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddass P, Balestrini R, Benabdellah K, Colard A, Croll D, Da Silva C, Gomez SK, Koul R, Ferrol N, Fiorilli V, Formey D, Franken P, Helber N, Hijri M, Lanfranco L, Lindquist E, Liu Y, Malbreil M, Morin E, Poulain

J, Shapiro H, van Tuinen D, Waschke A, Azcón-Aguilar C, Bonfante P, Harrison MJ, Kuster H, Lammers P, Paszkowski U, Requena N, Rensing SA, Roux C, Sanders IR, Shachar-Hill Y, Tuskan G, Young JP, Gianinazzi-Pearson V, Martin F (2012).

The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont.

New Phytol. 193 (3): 755-769. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2011.03948.x.

Tivoli B, Baranger A, Sivasithamparam K, Barbetti MJ (2006).

Annual *Medicago*: from a model crop challenged by a spectrum of necrotrophic pathogens to a model plant to explore the nature of disease resistance.

Ann Bot. 98 (6): 1117-1128.

Trentmann O, Jung B, Neuhaus HE, Haferkamp I (2008).

Nonmitochondrial ATP/ADP transporters accept phosphate as third substrate.

J Biol Chem. 283 (52): 36486-36493. DOI: 10.1074/jbc.M806903200.

Truong HN, Thalineau E, Bonneau L, Fournier C, Potin S, Balzergue S, VAN Tuinen D, Jeandroz S, Morandi D (2015).

The *Medicago truncatula* hypermycorrhizal B9 mutant displays an altered response to phosphate and is more susceptible to *Aphanomyces euteiches*.

Plant Cell Environ. 38 (1): 73-88. DOI: 10.1111/pce.12370.

Tsiafouli MA, Thiebaut E, Sgardelis SP, de Ruiter PC, van der Putten WH, Birkhofer K, Hemerik L, de Vries FT, Bardgett RD, Brady MV, Bjornlund L, Jørgensen HB, Christensen S, Hertefeldt TD, Hotes S, Gera Hol WH, Frouz J, Liiri M, Mortimer SR, Setälä H, Tzanopoulos J, Uteseny K, Piñíl V, Stary J, Wolters V, Hedlund K (2015).

Intensive agriculture reduces soil biodiversity across Europe.

Glob Chang Biol. 21 (2): 973-985. DOI: 10.1111/gcb.12752.

Tusnady GE, Simon I (1998).

Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction.

J Mol Biol. 283 (2): 489-506.

- Ulrich AE, Frossard E (2014).
On the history of a reoccurring concept: phosphorus scarcity.
Sci Total Environ. 490: 694-707. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.04.050.
- van Bel (1993).
Strategies of phloem loading.
Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 44: 253-282.
- Veresoglou SD, Halley JM, Rillig MC (2015).
Extinction risk of soil biota.
Nat Commun. 6: 8862. DOI: 10.1038/ncomms9862.
- Viola R, Roberts AG, Haupt S, Gazzani S, Hancock RD, Marmioli N, Machray GC, Oparka KJ (2001).
Tuberization in Potato Involves a Switch from Apoplastic to Symplastic Phloem Unloading.
The Plant Cell 13 (2): 385-398.
- Wagg C, Bender SF, Widmer F, van der Heijden MG (2014).
Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality.
Proc Natl Acad Sci U S A 111 (14): 5266-5270. DOI: 10.1073/pnas.1320054111.
- Walder F, van der Heijden MG (2015).
Regulation of resource exchange in the arbuscular mycorrhizal symbiosis.
Nat Plants. 1: 15159. DOI: 10.1038/nplants.2015.159.
- Wardlaw IF (1990).
The control of carbon partitioning in plants.
New Phytol;27:341-381.
- Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Gr  ner F, Hebbeker U, Flügge UI (2000).
Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator.
Plant Cell 12 (5): 787-802.
- Weber AP, Fischer K (2007).
Making the connections--the crucial role of metabolite transporters at the interface between chloroplast and cytosol.
FEBS Lett. 581 (12): 2215-2222.
- Weise A, Barker L, Kühn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB, Ward JM (2000).
A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants.
Plant Cell 12 (8): 1345-1355.
- Wingenter K, Schulz A, Wormit A, Wic S, Trentmann O, Hoermiller II, Heyer AG, Marten I, Hedrich R, Neuhaus HE (2010).
Increased activity of the vacuolar monosaccharide transporter TMT1 alters cellular sugar partitioning, sugar signaling, and seed yield in Arabidopsis.
Plant Physiol. 154 (2): 665-677. DOI: 10.1104/pp.110.162040.

Wolfenstetter S, Wirsching P, Dotzauer D, Schneider S, Sauer N (2012).
Routes to the Tonoplast: The Sorting of Tonoplast Transporters in Arabidopsis Mesophyll
Protoplasts.
The Plant Cell 24 (1): 215-232. DOI: 10.1105/tpc.111.090415.

Wormit A, Trentmann O, Feifer I, Lohr C, Tjaden J, Meyer S, Schmidt U, Martinoia E, Neuhaus
HE (2006).
Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide
transporter from Arabidopsis involved in vacuolar sugar transport.
Plant Cell 18 (12): 3476-3490.

Xu G, Fan X, Miller AJ (2012).
Plant nitrogen assimilation and use efficiency.
Annu Rev Plant Biol. 63: 153-182. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042811-105532.

Yachdav G, Kloppmann E, Kajan L, Hecht M, Goldberg T, Hamp T, Hönigsmid P,
Schafferhans A, Roos M, Bernhofer M, Richter L, Ashkenazy H, Punta M, Schlessinger A,
Bromberg Y, Schneider R, Vriend G, Sander C, Ben-Tal N, Rost B (2014).
PredictProtein--an open resource for online prediction of protein structural and functional
features.
Nucleic Acids Res. 42 (Web Server issue): W337-343. DOI: 10.1093/nar/gku366.

Yan N (2013).
Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters.
Trends Biochem Sci. 38 (3): 151-159. DOI: 10.1016/j.tibs.2013.01.003.

Young ND, Debellis F, Oldroyd GE, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Benedito VA, Mayer
KF, Gouzy J, Schoof H, Van de Peer Y, Proost S, Cook DR, Meyers BC, Spannagl M, Cheung F,
De Mita S, Krishnakumar V, Gundlach H, Zhou S, Mudge J, Bharti AK, Murray JD, Naoumkina
MA, Rosen B, Silverstein KA, Tang H, Rombauts S, Zhao PX, Zhou P, Barbe V, Bardou P,
Bechner M, Bellec A, Berger A, Bergelson H, Bidwell S, Bisseling T, Choisne N, Couloux A,
Denny R, Deshpande S, Dai X, Doyle JJ, Dudez AM, Farmer AD, Fouteau S, Franken C, Gibelin
C, Gish J, Goldstein S, González AJ, Green PJ, Hallab A, Hartog M, Hua A, Humphray SJ,
Jeong DH, Jing Y, Jöncker A, Kenton SM, Kim DJ, Klee K, Lai H, Lang C, Lin S, Macmill SL,
Magdelenat G, Matthews L, McCarrison J, Monaghan EL, Mun JH, Najar FZ, Nicholson C,
Noirot C, O'Bleness M, Paule CR, Poulain J, Prion F, Qin B, Qu C, Retzel EF, Riddle C, Sallet
E, Samain S, Samson N, Sanders I, Saurat O, Scarpelli C, Schiex T, Segurens B, Severin AJ,
Sherrier DJ, Shi R, Sims S, Singer SR, Sinharoy S, Sterck L, Viollet A, Wang BB, Wang K,
Wang M, Wang X, Warfsmann J, Weissenbach J, White DD, White JD, Wiley GB, Wincker P,
Xing Y, Yang L, Yao Z, Ying F, Zhai J, Zhou L, Zuber A, Dvornari J, Dixon RA, May GD,
Schwartz DC, Rogers J, Quétier F, Town CD, Roe BA (2011).
The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses.
Nature 480 (7378): 520-524. DOI: 10.1038/nature10625.

Zhang L, Hüsler RE, Greiten C, Hajirezaei MR, Haferkamp I, Neuhaus HE, Flügge UI,
Ludewig F (2008).
Overriding the co-limiting import of carbon and energy into tuber amyloplasts increases the
starch content and yield of transgenic potato plants.
Plant Biotechnol J. 6 (5): 453-464. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2008.00332.x.

Zhu YG, Miller RM (2003).
Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems.
Trends Plant Sci. 8 (9): 407-409.

Zuccarini P, Okurowska P (2008).
Effects of Mycorrhizal Colonization and Fertilization on Growth and Photosynthesis of Sweet
Basil Under Salt Stress.
Journal of Plant Nutrition 31(3): 497-513. DOI: 10.1080/01904160801895027.